



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος της caveolin -1 στην οστεοαρθρίτιδα»

ΓΚΑΤΖΟΥ ΑΡΙΑΔΝΗ
ΔΙΑΤΡΟΦΟΛΟΓΟΣ-ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Επιβλέπων/ουσα)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Μέλος)

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

«Role of caveolin-1 in osteoarthritis»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της κ. Ασπασίας Τσέζου, καθηγήτριας Ιατρικής Γενετικής. Της εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου πρόσφερε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την διδάκτορα Παπαθανασίου Ιωάννα, κωστοπούλου Φωτεινή και Εύη Μουρμούρα για τη συμβουλευτική καθοδήγηση τους. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

*Γκατζού Αριάδνη
Λάρισα, 2 Ιουλίου 2015*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	3
Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη.....	5
A.γενικό μέρος.....	7
A.1 Ο αρθρικός χόνδρος.....	8
A.1.1 Δομή του αρθρικού χόνδρου.....	9
A.1.2 Εξωκυττάρια ουσία	10
A.1.3 Πρωτεογλυκάνες	10
A.1.4 Κολλαγόνο.....	11
A.1.5 Χονδροκύτταρα.....	11
A.2 Οστεοαρθρίτιδα.....	11
A.2.1 Μεταβολή στην σύνθεση του χόνδρου και η οστεοαρθρίτιδα.....	14
A.2.2 Μεταβολές στο μεταβολισμό των χονδροκυττάρων και στη λειτουργία τους.....	14
A.2.2.1 Αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια ουσία.....	14
A.2.2.2 Υπερτροφία των χονδροκυττάρων.....	15
A.3 Το μεταβολικό σύνδρομο και η οστεοαρθρίτιδα.....	18
A.3.1 Οι δυσλιπιδαιμίες και η οστεοαρθρίτιδα.....	19
A.3.2 Η παχυσαρκία και η οστεοαρθρίτιδα.....	20
A.4 Η Caveolin-1.....	20
A.4.1 Η Caveolin-1 και η ίνωση.....	21
A.4.2 Η Caveolin-1 και αλληλεπίδραση κυττάρου-ECM.....	22
A.4.3 Η Caveolin-1 και πως σχετίζεται με το μεταβολικό σύνδρομο.....	22
A.4.4 ΗCaveolin-1 και η οστεοαρθρίτιδα.....	23
A.5 Πολυμορφισμοί.....	24
A.5.1 Η Caveolin-1 και πολυμορφισμοί σε διάφορες παθήσεις.....	25
A.6 Σκοπός	27
B. Ειδικό μέρος.....	28
B.1 Υλικά και μέθοδοι.....	29
B.1.1 Πληθυσμιακό δείγμα	29
B.1.2 Επιλογή του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού του γονιδίου της Caveolin-1 (rs8713).....	29
B.1.3 Απομόνωση του DNA από περιφερικό αίμα.....	29
B.1.4 Ηλεκτροφόρηση.....	30
B.1.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	31
B.1.6 Στατιστική ανάλυση.....	32
B.2 Αποτελέσματα.....	33
B.3 Συζήτηση.....	35
Βιβλιογραφία.....	37

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα πλήττει εκατομμύρια άτομα σε όλο τον κόσμο και έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ποιότητας ζωής και την αύξηση του κόστους της δημόσιας υγείας. Στους παράγοντες της νόσου συγκαταλέγονται η γενετική προδιάθεση, η γήρανση και η παχυσαρκία, Ωστόσο, δεν έχει προσδιοριστεί με βεβαιότητα η άμεση αιτιολόγησή της. Πρόκειται για μία εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, που χαρακτηρίζεται κυρίως από προοδευτική εκφύλιση του αρθρικού χόνδρου. Η απώλεια των πρωτεογλυκανών και η υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων αποτελούν χαρακτηριστικά της νόσου. Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΟΑ περιλαμβάνουν συνήθως πόνο στις αρθρώσεις, ευαισθησία, δυσκαμψία, κλείδωμα των αρθρώσεων και μερικές φορές μια τοπική φλεγμονή. Η πρωτοπαθής οστεοαρθρίτιδα είναι γενικά ένα αποτέλεσμα ανισορροπίας στις φυσικοχημικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου κατά την μηχανική καταπόνηση ενώ η δευτεροπαθής σχετίζεται με φλεγμονώδεις παθήσεις των αρθρώσεων, καθώς επίσης και με ορμονικές και μεταβολικές διαταραχές. Ένα από τα χαρακτηριστικά της νόσου είναι η καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) που είναι το κύριο λειτουργικό στοιχείο του αρθρικού χόνδρου. Στην οστεοαρθρίτιδα, η καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου οδηγεί σε προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των αρθρώσεων. Εκτός από την υποβάθμιση των μοριακών συστατικών της ECM, λαμβάνουν επίσης μέρος και η αποσταθεροποίηση υπερμοριακών δομών όπως το δίκτυο κολλαγόνου αλλά και αλλαγές στην έκφραση των μορίων της ECM. Η ταυτοποίηση των γονιδίων που συνδέονται με την ΟΑ είναι ιδιαίτερα σημαντική ώστε να μελετηθούν εκείνοι οι μηχανισμοί και τα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στην ανάπτυξη της με στόχο την ανεύρεση στοχευμένων θεραπειών.

Τα caveolae είναι εγκοιλώσεις της πλασματικής μεμβράνης μεγέθους 50-100 nm εμπλουτισμένα σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια που βρίσκονται σε αφθονία σε διαφοροποιημένα κύτταρα όπως είναι οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά και τα μυϊκά κύτταρα. Η καβεολίνη (21 έως 23 kDa) σχηματίζει ολιγομερή και συνδέεται με χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια σε ορισμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των εγκοιλώσεων. Η καβεολίνη συνιστά μια μεμβρανική πρωτεΐνη και απαντάται σε τρεις ισομορφές με παρόμοια δομή την καβεολίνη 1, 2 και 3. Οι καβεολίνες 1 και 2 συν-εκφράζονται σε πολλούς ιστούς και ειδικότερα σε διαφοροποιημένα κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λιποκύτταρα, τους ινοβλάστες και στα πνευμονοκύτταρα τύπου I, ενώ η καβεολίνη 3 είναι μια ειδική μυϊκή-πρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο σε γραμμωτούς τύπους μυϊκών κυττάρων (καρδιακών και σκελετικών). Οι καβεολίνες επιπλέον λειτουργούν ως scaffolding πρωτεΐνες σε πολλά μόρια σηματοδοτικών μονοπατιών των cavelae ρυθμίζοντας παράλληλα και την δραστηριότητά τους. Και οι 3 τύποι σχηματίζουν βρόχους τα οποία είναι τοποθετημένα εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Τόσο το C-τελικό άκρο και τα N-άκρο ανευρίσκονται στη κυτταροπλασματική πλευρά

της μεμβράνης. Υπάρχουν δύο ισομορφές της caveolin-1: η caveolin-1α και η caveolin-1β της οποίας λείπει ένα τμήμα του N-τελικού άκρου. Επιπλέον πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι η caveolin-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας. Η οστεοαρθρίτιδα εντάσσεται πλέον στο μεταβολικό σύνδρομο ως μεταβολική οστεοαρθρίτιδα και χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και ορμονικές διαταραχές. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την συσχέτιση μεταξύ της οστεοαρθρίτιδας, των δυσλιπιδαιμιών, της υπέρτασης και της υπεργλυκαιμίας, παραγόντων που συνιστούν το μεταβολικό σύνδρομο.

Επίσης το οξειδωτικό στρές και η φλεγμονή είναι παράγοντες που συμβάλλουν στην αιτιολογία της οστεοαρθρίτιδας και του μεταβολικού συνδρόμου. Εκτιμώντας τις πτυχές του Μεταβολικού συνδρόμου, συμβάλλουν σαφώς στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, ωστόσο, η αμοιβαία επιρροή της οστεοαρθρίτιδας για τις άλλες συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου είναι λιγότερο σαφής μέχρι τώρα. Η caveolin-1 αντίστοιχα φαίνεται να παίζει ρόλο των στη ρύθμιση της λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών του μεταβολισμού συντείνοντας στην παθολογία του μεταβολικού συνδρόμου ενώ ταυτόχρονα μέσω της κυτταρικής γήρανσης συντελεί στην αιτιολογία και της οστεοαρθρίτιδας ωστόσο όμως η βιβλιογραφία είναι ελάχιστη.

Σκοπός της ερευνάς μας είναι να διερευνήσουμε τον ρόλο της καβεολίνης 1 στην οστεοαρθρίτιδα μελετώντας τον πολυμορφισμό rs8713 με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 533 δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ (n=274) και την ομάδα ελέγχου άτομα που νοσηλεύτηκαν για ακρωτηριασμούς ή σοβαρά κατάγματα, χωρίς κανένα ιστορικό ΟΑ (n= 254). Μετά την απομόνωση DNA, τα δείγματα προετοιμάστηκαν κατάλληλα για τον προσδιορισμό των γονοτύπων μέσω της διαδικασίας διαχωρισμού των αλληλομόρφων (Allelic Discrimination Assays).

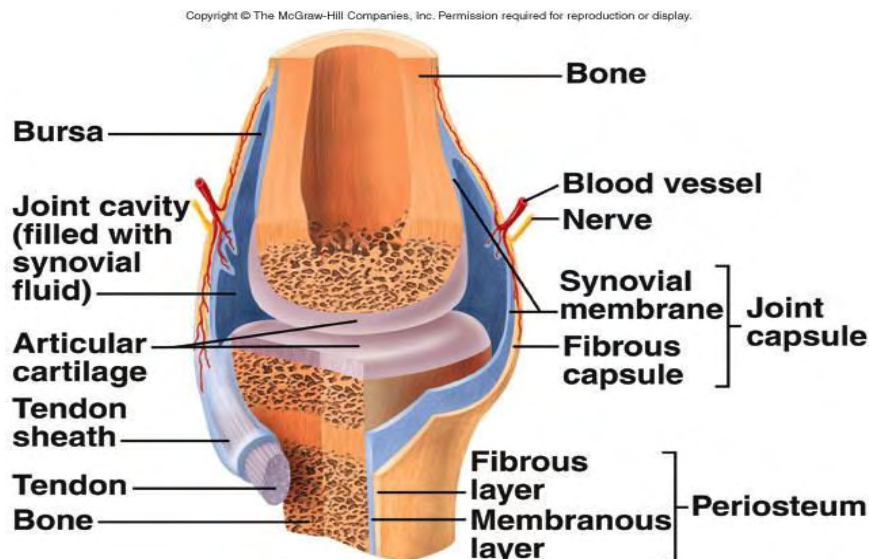
Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs8713 με τον κίνδυνο ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή του ετερόζυγου (AC) γονοτύπου μεταξύ των ατόμων της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή του ομόζυγου (CC) γονοτύπου μεταξύ των ατόμων της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου στους ΟΑ ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω ερευνητική μελέτη προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην παθογένεια της νόσου.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Ο Αρθρικός χόνδρος

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας πολύ εξειδικευμένος ιξωδοελαστικός συνδετικός ιστός που επικαλύπτει τα άκρα των οστών στους αρθρικούς συνδέσμους. Δομικά στερείται των αιμοφόρων αγγείων, των νεύρων ή των λεμφαγγείων, ενώ επίσης επιτρέπει την ομαλή με ελάχιστη τριβή κίνηση των αρθρικών επιφανειών[1,2].



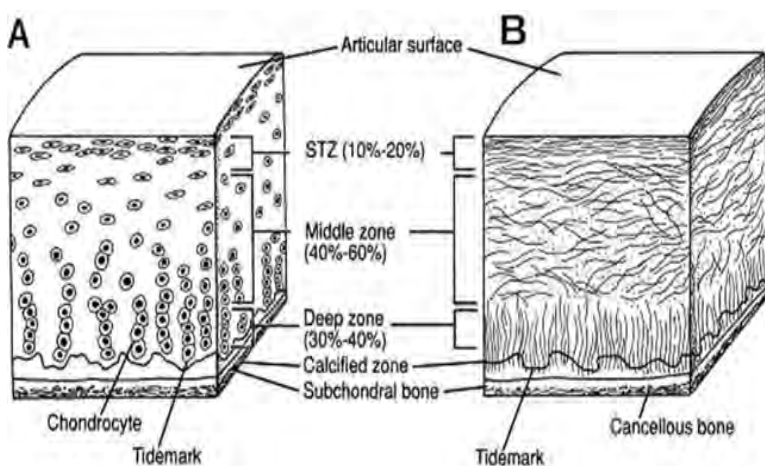
Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση μιας άρθρωσης και των περιαρθρικών μορίων

Βασική λειτουργία του αρθρικού χόνδρου είναι η κατανομή των φορτίων και η μείωση των πιέσεων στο υποχόνδριο οστό. Κατά τη διάρκεια της φόρτισης παραμορφώνεται και μετά την άρση της λαμβάνει πάλι το αρχικό του σχήμα[3]. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και η χαμηλή διαπερατότητα του αρθρικού χόνδρου επιτρέπουν την αποτελεσματική μετάδοση του φορτίου, ενώ οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ του νερού και των πρωτεογλυκάνων παρέχουν αντίσταση στην συμπίεση. Τα κύρια συστατικά του αρθρικού χόνδρου περιλαμβάνουν το νερό, την εξωκυττάρια ουσία (ECM) και τα χονδροκύτταρα. Έως και 80% του υγρού βάρους του αρθρικού χόνδρου τροφοδοτείται από το νερό. Ο μόνος τύπος κυττάρου εντός του χόνδρου είναι τα χονδροκύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από ελάχιστη μεταβολική δραστηριότητα καθώς και ελάχιστη ή καμία κυτταρική διαίρεση. Τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση, τη σύνθεση και την οργάνωση της μήτρας, η οποία καθορίστηκε κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής της ανάπτυξης. Οι βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χονδροκυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας που διατηρούν τον ιστό. Τα χονδροκύτταρα σχηματίζουν το μακρομοριακό πλαίσιο της εξωκυττάριας ουσίας του ιστού από τρεις κατηγορίες μορίων: τα κολλαγόνα, τις πρωτεογλυκάνες και τις μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες και διατηρούν την εξωκυττάρια ουσία (ECM) [4]. Η ροή του νερού διαμέσου του αρθρικού χόνδρου διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παροχή θρεπτικών συστατικών με διάχυση προς τα χονδροκύτταρα και βοηθά στην λίπανση της επιφάνειας των αρθρώσεων [3].

A.1.1 Δομή του Αρθρικού Χόνδρου

Η δομή του μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις ζώνες, η καθεμία με μοναδικές ιδιότητες.

Η λεπτή επιφανειακή (εφαπτομενική) ζώνη προστατεύει τα βαθύτερα στρώματα από τις διατμητικές τάσεις και αποτελεί περίπου το 10% έως 20% του πάχους του αρθρικού χόνδρου. Οι ίνες κολλαγόνου της ζώνης αυτής (κυρίως τύπου II και IX) είναι συμπυκνωμένες και ευθυγραμμισμένες παράλληλα προς την επιφάνεια του αρθρικού χόνδρου[4,5]. Το επιφανειακό στρώμα περιλαμβάνει ένα σχετικά υψηλό αριθμό πεπλατυσμένων χονδροκυττάρων και η ακεραιότητα της στρώσης αυτής είναι απαραίτητη για την προστασία και τη συντήρηση των βαθύτερων στρωμάτων. Επιπλέον αυτή η ζώνη επικοινωνεί με το αρθρικό υγρό και είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις ιδιότητες εφελκυσμού του χόνδρου, που του επιτρέπουν να αντιστέκεται στις θλιπτικές δυνάμεις που επιβάλλονται από την άρθρωση. Η μεσαία (μεταβατική) ζώνη, λειτουργεί ως μια ανατομική και λειτουργική γέφυρα μεταξύ των επιφανειακών και των βαθύτερων ζωνών. Η μεσαία ζώνη αντιπροσωπεύει το 40% έως 60% του συνολικού όγκου του χόνδρου και περιέχει πρωτεογλυκάνες και παχύτερα ινίδια κολλαγόνου. Σε αυτό το στρώμα, το κολλαγόνο οργανώνεται λοξά και τα χονδροκύτταρα είναι σφαιρικά και σε μικρότερη πυκνότητα. Λειτουργικά, η μεσαία ζώνη είναι η πρώτη γραμμή της αντίστασης σε συμπιεστικές δυνάμεις. Η βαθιά ζώνη είναι υπεύθυνη να παρέχει τη μεγαλύτερη αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης που ασκούνται, δεδομένου ότι τα ινίδια κολλαγόνου διατάσσονται κάθετα προς την αρθρική επιφάνεια. Επιπλέον η βαθιά ζώνη περιέχει τα μεγαλύτερα σε διάμετρο ινίδια κολλαγόνου στην ακτινική διάταξη, το υψηλότερο ποσοστό πρωτεογλυκάνων και την χαμηλότερη συγκέντρωση νερού. Τα χονδροκύτταρα συνήθως είναι διατεταγμένα σε κιονοειδή προσανατολισμό, παράλληλα με τις ίνες κολλαγόνου και κάθετα προς την άρθρωση. Η βαθιά ζώνη αντιπροσωπεύει περίπου το 30% του όγκου του αρθρικού χόνδρου. Στο ανώτατο σημείο διαχωρίζεται η βαθιά ζώνη από την ασβεστοποιημένη ζώνη. Η βαθιά ζώνη είναι υπεύθυνη για την μεγαλύτερη δυνατή αντίσταση σε δυνάμεις θλίψεως, δεδομένης της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεογλυκάνη. Τα ινίδια κολλαγόνου διατάσσονται κάθετα προς τον αρθρικό χόνδρο. Το ασβεστοποιημένο στρώμα παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διασφάλιση του χόνδρου στα οστά. Στη ζώνη αυτή, ο πληθυσμός των κυττάρων είναι ελάχιστος και τα χονδροκύτταρα υπερτροφικά.



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα διατομής του υγιούς αρθρικού χόνδρου: A- κυτταρική οργάνωση στις ζώνες του αρθρικού χόνδρου, B- η αρχιτεκτονική των ινών κολλαγόνου. (Copyright American Academy of Orthopaedic Surgeons. Reprinted from the *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 1994;2:192-201.

A.1.2 Εξωκυττάρια ουσία

Η εξωκυττάρια ουσία (ECM) αντιπροσωπεύει περίπου το 95% του ξηρού βάρους του αρθρικού χόνδρου και παρέχει αντίσταση στη ροή του νερού. Η αγγρεκάνη και το κολλαγόνο τύπου II είναι οι πλέον άφθονες πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στην ECM στον αρθρικό χόνδρο και συνδέονται μεταξύ τους με έναν αριθμό πρωτεϊνών κολλαγόνου συμπεριλαμβανομένων των COMP (Cartilage oligomeric matrix protein). Η αγγρεκάνη είναι μια μεγάλη πρωτεογλυκάνη η οποία σε συνδυασμό με την υαλουρονάνη (HA) και μια πρωτεΐνη σύνδεσης σχηματίζουν συσσωμάτια. Αυτά τα συσσωματώματα είναι υπεύθυνα να παρέχουν τις οσμωτικές ιδιότητες ώστε να αντιστέκονται σε φορτία θλίψεως και να συγκρατούν το νερό. Επίσης περιέχουν μία ποικιλία SLRPs (small leucine-rich repeat proteoglycans) όπως ντεκορίνη, διγλυκάνη, ινωδομοντουλίνη και λουμικάνη, όπου βοηθούν στη διατήρηση της ακεραιότητας του ιστού και ρυθμίζουν το μεταβολισμό του[6]. Επιπλέον η ECM μπορεί να διαιρεθεί σε περικυτταρικές, χωρικές και διαπεριφερειακές περιοχές. Η περικυτταρική μήτρα είναι μία λεπτή στιβάδα προσκείμενη στην κυτταρική μεμβράνη, που περιβάλλει πλήρως το χονδροκύτταρο. Περιέχει κυρίως πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες αλλά και άλλες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες. Αυτή η περιοχή της μήτρας μπορεί να παίζει ένα λειτουργικό ρόλο για την κίνηση μεταγωγής σήματος εντός του χόνδρου[7]. Η χωρική μήτρα περιβάλλει την περικυτταρική μήτρα. Αυτή η περιοχή είναι παχύτερη από την περικυτταρική μήτρα και ρόλος της είναι να προστατεύει τα κύτταρα του χόνδρου κατά τις μηχανικές καταπονήσεις ενώ συμβάλλει στην ανθεκτικότητα του αρθρικού χόνδρου και την ικανότητά του να αντέχει σε σημαντικά φορτία[8]. Η διαπεριφερειακή περιοχή είναι η μεγαλύτερη από τις 3 αυτές περιοχές και συμβάλλει περισσότερο στις μηχανικές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου. Χαρακτηρίζεται από τις τυχαία προσανατολισμένες δέσμες των ινιδίων κολλαγόνου, διατεταγμένες παράλληλα προς την επιφανειακή ζώνη, πλαγίως στη μέση ζώνη, και κάθετα προς την αρθρική επιφάνεια στην βαθιά ζώνη. Οι πρωτεογλυκάνες βρίσκονται σε αφθονία στην ζώνη αυτή[9].

A.1.3 Πρωτεογλυκάνες

Η δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα μακρομορίων είναι οι πρωτεογλυκάνες, οι οποίες αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό πυρήνα με ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκάνης και είναι πολύ σημαντικές για την προστασία του δικτύου του κολλαγόνου. Οι κύριες πρωτεογλυκάνες που ανευρίσκονται στον αρθρικό χόνδρο περιλαμβάνουν την αγγρεκάνη, ντεκορίνη, διγλυκάνη, ινωδομοντουλίνη με την αγγρεκάνη να είναι η πιο άφθονη[10]. Η μεγαλύτερη σε μέγεθος και αφθονότερη κατά βάρος είναι η αγγρεκάνη, μια πρωτεογλυκάνη που διαθέτει περισσότερα από 100 αλυσίδες θεικής χονδροϊτίνης και θεικής κερατίνης. Χαρακτηρίζεται από την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με την υαλουρονάνη (HA) για να σχηματίσουν μεγάλες συσσωματώσεις πρωτεογλυκάνων μέσω πρωτεϊνών σύνδεσης[11]. Η COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) δρα ως καταλύτης στο κολλαγόνο ινιδιογένεσης και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κολλαγόνου IX και COMP ή της matrilin-3 είναι απαραίτητη για τη σωστή διαμόρφωση και συντήρηση της μήτρας του αρθρικού χόνδρου. Η περλεκάνη

ενισχύει το σχηματισμό ινιδίων και μικροϊνιδίων του κολλαγόνου VI και συνδέει το κολλαγόνο II με την αγγρεκάνη μέσω συμπλοκών matrilin-1 και διγλυκάνης ή δεκορίνης[12].

A.1.4 Κολλαγόνο

Το κυριότερο μακρομόριο που βρίσκεται στον αρθρικό χόνδρο είναι το κολλαγόνο. Το κολλαγόνο τύπου II αντιπροσωπεύει το 90% -95% της συνολικής περιεκτικότητας σε κολλαγόνο και τους τύπους I, IV, V, VI, IX και XI να αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο[3]. Υπάρχουν τουλάχιστον 15 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου που αποτελούνται τουλάχιστον από 29 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Επιπλέον όλα τα μέλη της οικογένειας του κολλαγόνου περιέχουν μία περιοχή που αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α-αλυσίδες). Η σύνθεση των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι κατά κύριο λόγο η γλυκίνη και η προλίνη, ενώ η υδροξυπρολίνη παρέχει σταθερότητα μέσω των δεσμών υδρογόνου κατά το μήκος του μορίου. Η τριπλή δομή της έλικας των πολυπεπτιδικών αλυσίδων προσδίδει του αρθρικού χόνδρου ιδιότητες διάτμησης και εφελκυσμού, οι οποίες βοηθούν να σταθεροποιηθεί η μήτρα[13].

A.1.5 Χονδροκύτταρα

Το πρωτογενές κυτταρικό συστατικό του αρθρικού χόνδρου είναι τα χονδροκύτταρα.

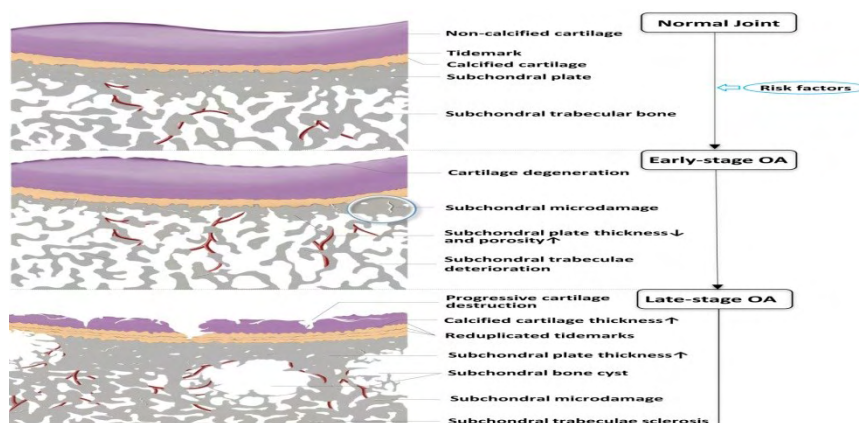
Αυτά τα κύτταρα είναι σε μεγάλο βαθμό αναερόβια, έχουν περιορισμένη κυτταρική επικοινωνία και παρουσιάζουν χαμηλό δυναμικό για αντιγραφή. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι υπεύθυνα και για την περιορισμένη επιδιόρθωση του αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και αποτελούν περίπου το 2% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου[2]. Σε μεταβολικό επίπεδο τα χονδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και την επισκευή της ECM μέσω μιας ομάδας αποικοδομητικών ενζύμων. Η μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων μεταβάλλεται μέσω κάποιων παραγόντων. Έτσι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (όπως η ιντερλευκίνη-1 και ο Tnf -α) ασκούν καταβολικές και αναβολικές επιδράσεις παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση και στη σύνθεση των μακρομορίων της εξωκυττάριας ουσίας[14].

A.2 Οστεοαρθρίτιδα

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), είναι γνωστή ως εκφυλιστική αρθρίτιδα ή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων. Αποτελεί τη πιο συχνή ασθένεια των αρθρώσεων που χαρακτηρίζεται από απώλεια του αρθρικού χόνδρου, αναδιαμόρφωση του υποχόνδριου οστού, σχηματισμό οστεοφύτων, συνδεσμική χαλαρότητα, αποδυνάμωση των περιαρθρικών μυών και πύκνωση της αρθρικής κάψουλας[15,16]. Επιπλέον στην οστεοαρθρίτιδα μια ποικιλία των πιθανών παραγόντων (κληρονομικές, αναπτυξιακές, μεταβολικές και μηχανικές αλλαγές) οδηγούν σε απώλεια του αρθρικού χόνδρου και του υποχόνδριου οστού. Είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις μυοσκελετικές παθολογικές καταστάσεις, η οποία επηρεάζει περίπου το 10% του παγκόσμιου πληθυσμού ηλικίας άνω των 60 ετών[15]. Επιπλέον είναι μια πάθηση που σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη γήρανση. Η συχνότητα εμφάνισης της

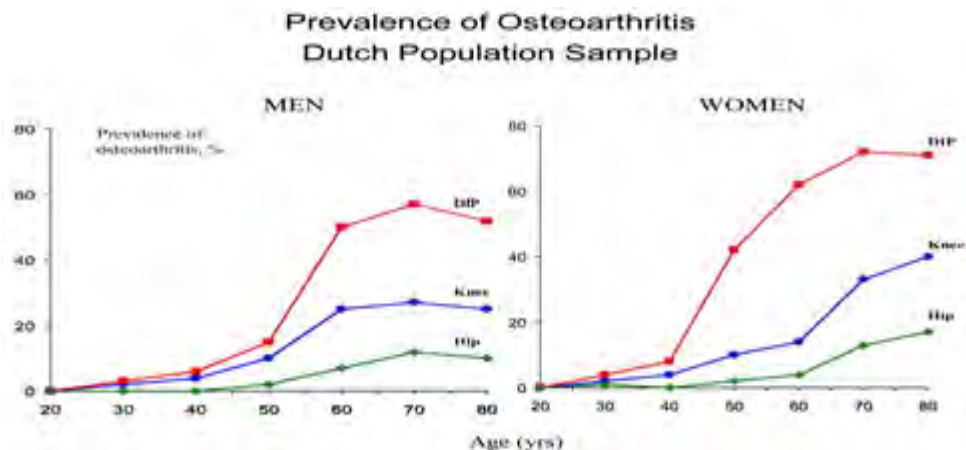
οστεοαρθρίτιδας αυξάνει με την ηλικία, αλλά η σοβαρότητα των αλλοιώσεων της δεν εξαρτάται από αυτήν[17].

Οι κλινικές εκδηλώσεις της οστεοαρθρίτιδας περιλαμβάνουν συνήθως πόνο στις αρθρώσεις, ευαισθησία, δυσκαμψία, κλείδωμα των αρθρώσεων και μερικές φορές τοπική φλεγμονή. Η οστεοαρθρίτιδα μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε άρθρωση, αλλά πιο συχνά επηρεάζει τα γόνατα, τα ισχία, τα χέρια, τις αρθρώσεις της σπονδυλικής στήλης και τα πόδια. Η εξέλιξη της νόσου είναι συνήθως αργή.



Εικόνα 3: Υποθετικό μοντέλο παθογένεσης της οστεοαρθρίτιδας (ΟΑ). Στο φυσιολογικό υποχόνδριο οστό που πάσχει από μη-φυσιολογικές καταπονήσεις(που προκαλούνται από παράγοντες κινδύνου) αρχίζει μια παθολογική κατάσταση, οδηγώντας σε οστεοαρθρικές αλλαγές σε διαφορετικούς ιστούς. Στο πρώιμο στάδιο της ΟΑ, η υποχόνδρια πλάκα γίνεται λεπτότερη και πιο πορώδη ταυτόχρονα με την αρχική εκφύλιση του χόνδρου. Το υποχόνδριο σπογγώδες οστό επιδεινώνεται επίσης με αυξημένο διαχωρισμό. Ταυτόχρονα, μικροβλάβες αρχίζουν να εμφανίζονται στο αβαστοποιημένο χόνδρο και το υποχόνδριο οστό οι οποίες θα συνεχιστούν σε όλη τη παθολογική διαδικασία. Στα τελικά στάδια της ΟΑ, ο αβαστοποιημένος χόνδρος και η υποχόνδρια πλάκα γίνονται παχύτερα, με αναδιπλασιασμό του ανώτατου σημείου της πλημμυρίδος και η προοδευτική βλάβη του χόνδρου. Το υποχόνδριο σπογγώδες οστό γίνεται αρτηριοσκληρωτικό. Η σκλήρυνση των περιαρθρικών ανοργανοποιημένων ιστών μπορεί να είναι μια αντισταθμιστική προσαρμογή στις μικροβλάβες στο υποχόνδριο οστό που καθιστούν την υποχόνδρια δομή των οστών πιο εύθραυστη[18]

Η οστεοαρθρίτιδα πλήττει εκατομμύρια άτομα σε όλο τον κόσμο και έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ποιότητας ζωής και την αύξηση του κόστους της δημόσιας υγείας. Το 2005, υπολογίστηκε ότι πάνω από 26 εκατομμύρια άνθρωποι στις ΗΠΑ είχαν κάποια μορφή ΟΑ[19]. Ο επιπολασμός της ΟΑ, όμως, ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και τη γεωγραφική περιοχή όπου μελετάται.



Εικόνα 4: επιπολασμός της οστεαρθρίτιδας του χεριού, του ισχίου και του γόνατος[20]

Παράγοντες κινδύνου όπως η παχυσαρκία, οι μεταβολικές ασθένειες, η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα και η φυλή, η γενετική, η διατροφή, το κάπνισμα, η πυκνότητα των οστών και η λειτουργία των μυών σχετίζονται με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας.

Η σχέση μεταξύ της ηλικίας και του κινδύνου ανάπτυξης της οστεοαρθρίτιδας είναι πιθανόν πολυπαραγοντική αλλά και συνέπεια πολλών μεμονωμένων παραγόντων όπως η οξειδωτική βλάβη, η λέπτυνση του χόνδρου και η αποδυνάμωση του μυός.

Επιπλέον, οι βασικοί κυτταρικοί μηχανισμοί που διατηρούν την ομοιόσταση των ιστών μειώνεται με την ηλικία, οδηγώντας σε ανεπαρκή ανταπόκριση στο στρες ή σε κακώσεις της άρθρωσης και την επακόλουθη καταστροφή και απώλεια του αρθρικού ιστού.

Η συχνότητα εμφάνισης ανάπτυξης οστεοαρθρίτιδας στο γόνατο, το ισχίο και στο χέρι αυξάνει με την ηλικία και είναι υψηλότερο στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες ιδίως μετά την ηλικία των 50 ετών και στις γυναίκες αυξάνει δραματικά γύρω από την περίοδο της εμμηνόπαυσης. Το τελευταίο εύρημα έχει οδηγήσει τους ερευνητές να υποθέτουν ότι ορμονικοί παράγοντες μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας[21,22]. Μια σταθεροποίηση ή υποχώριση εμφανίζεται σε όλες τις αρθρώσεις γύρω από την ηλικία των 80 χρόνων.

Η παχυσαρκία έχει περιγραφεί ως παράγοντας κινδύνου για την ΟΑ με ανάπτυξη μηχανικών παραγόντων και εκφυλιστικών πόνων στο γόνατο. Οι μηχανισμοί μεταξύ της παχυσαρκίας και της οστεοαρθρίτιδας δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά έχει βρεθεί από μελέτες ότι η απελευθέρωση των μορίων λίπους συμπεριλαμβανομένων αντιποκινών όπως βισφατίνης και λεπτίνη μπορεί να επηρεάσουν τις διαδικασίες στις αρθρώσεις όπως την φλεγμονώδη απόκριση[23,24].

Υπήρξαν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με το ρόλο του καπνίσματος στην οστεοαρθρίτιδα. Μερικές μελέτες έχουν αναφέρει μια προστατευτική συσχέτιση μεταξύ του καπνίσματος και της οστεοαρθρίτιδας, αλλά και άλλοι αντίθετα, αναφέρουν ότι το κάπνισμα μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο απώλειας του χόνδρου και πόνο στο γόνατο. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση των μελετών παρατήρησης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η προστατευτική επίδραση του καπνίσματος στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας (OR 0,87 95% CI 0,80 - 0,94) που παρατηρείται είναι πιθανό να είναι ψευδής[25]. Η οστεοπόρωση όπως και η οστεοαρθρίτιδα, σχετίζεται με σκελετική διαταραχή. Ενώ τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εμφάνιση μειωμένης οστικής πυκνότητας μπορεί να είναι προστατευτική έναντι της οστεοαρθρίτιδας, περαιτέρω μελέτες έχουν αντίθετα αποτελέσματα με τα εύρημα αυτά. Μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας του γόνατος, έχει δείξει σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας ότι υπάρχει μια σταθερή ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης οστικής πυκνότητας και της έναρξης οστεοαρθρίτιδας του γόνατος στις γυναίκες[26]. Γενετικοί καθώς και επίκτητοι παράγοντες, μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου[27].

Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς της οστεοαρθρίτιδας. Σχεδόν όλοι οι ορισμοί της οστεοαρθρίτιδας εκφράζουν την ασθένεια ως διαλείπουσα αλλά προοδευτική με δομικές

αλλαγές σε αρθρικούς ιστούς, κυρίως του αρθρικού χόνδρου, του υποχόνδριου οστού, του αρθρικού υμένα και του αρθρικού υγρού[28].

Οίδημα του αρθρικού χόνδρου, μαρμαρυγή και η διάβρωση που συνοδεύεται από πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και μειωμένη χρώση των πρωτεογλυκανών της θεμέλιας ουσίας, πύκνωση των οστών, παραμόρφωση της αρθρικής επιφάνειας, σχηματισμός οστεοφύτων, αρθρική υπερπλασία των κυττάρων του έσω χιτώνα είναι τα κύρια χαρακτηριστικά που συνδέονται με την οστεοαρθρίτιδα[29].

A.2.1 Μεταβολή στη σύνθεση του χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα

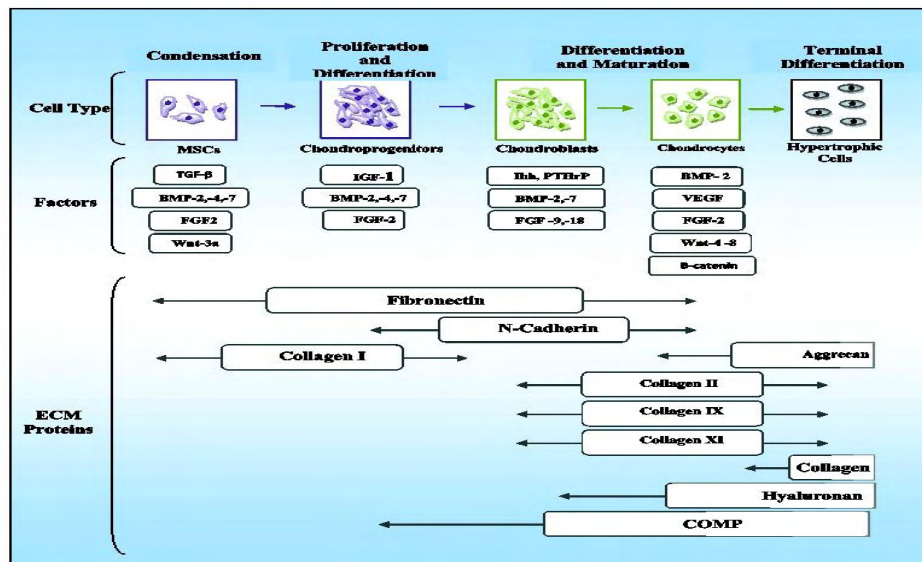
Η φυσιολογική γήρανση, η γήρανση του χόνδρου και τα αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS) είναι φυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μυοσκελετικό σύστημα και συμβάλλουν στην ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας[30]. Η Φλεγμονή θεωρείται ως ένα πολύ πρώιμο γεγονός στην οστεοαρθρίτιδα και ίσως προκαλείται από τραύμα της άρθρωσης επηρεάζοντας χονδροκύτταρα και αρθρικά κύτταρα (ινοβλάστες και μακροφάγα) να παράγουν κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF -α), καθώς και άλλα μόρια σηματοδότησης όπως πρωτεογλυκάνες με σκοπό την έναρξη ή την αύξηση των καταβολικών διεργασιών[31]. Μηνισκική στένωση, απώλεια χόνδρου και αρθρικές βλάβες αυξάνουν τον κίνδυνο της δευτερογενούς οστεοαρθρίτιδας με εκφύλιση του χόνδρου. Αυτή η δευτεροπαθής οστεοαρθρίτιδα συνδέεται με χόνδρινη βλάβη, συνδεσμική αστάθεια και κακή ευθυγράμμιση καθώς και με τη μείωση της ικανότητας απορρόφησης κραδασμών του γονάτου[32].

A.2.2 Μεταβολές στο μεταβολισμό των χονδροκυττάρων και στη λειτουργία

A.2.2.1 Αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια ουσία

Η επίδραση του κολλαγόνου IX στη λειτουργία και την ακεραιότητα του χόνδρου έχει ερευνηθεί σε διάφορα μοντέλα ποντικού. Είναι ενδιαφέρον, ότι έχει δείχθει πως η έλλειψη κολλαγόνου IX επηρεάζει σοβαρά την ανάπτυξη της πλάκας ειδικά σε νεογέννητα ζώα, ενώ δεν υπάρχουν αλλαγές στον αρθρικό χόνδρο. Τα χονδροκύτταρα είναι λιγότερο πεπλατυσμένα και η κιονοειδή διάταξη είναι εντελώς απύσχα σε αυτές τις πλάκες ανάπτυξης[33].

Επιπλέον, δείχθηκε ότι αλλαγές όπως η μείωση της πρωτεογλυκάνης και η αποσταθεροποίηση του υπερμοριακού δικτύου κολλαγόνου οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και μερική απώλεια του φαινοτύπου του αρθρικού χόνδρου[34] υπογραμμίζοντας έτσι τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ των χονδροκυττάρων και της εξωκυτταρικής μήτρας. Η σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής για τη διατήρηση της ομοιόστασης του χόνδρου διαφαίνεται επίσης από τα στοιχεία τα οποία αποδεικνύουν ότι η ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης της εξωκυττάριας ουσίας και της υποβάθμισής της διαταράσσεται σε ρευματικές παθήσεις και συνδέεται συχνά με αποδιαφοροποίηση των χονδροκυττάρων ή / και με απόπτωση τους[35].



Εικόνα 5 : Σχηματικό διάγραμμα των σταδίων της χονδρογένεσης, οι κύριοι παράγοντες ανάπτυξης που εμπλέκονται σε κάθε στάδιο και οι συνοδευτικές μεταβολές στην ECM

Πηγή(www.intechopen.com/books/tissue-engineering-for-tissue-and-organ-regeneration/cartilage-tissue-engineering-the-application-of-nanomaterials-and-stem-cell-technology)

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί αφετηρία και στόχο διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από τον FGF[36], το Wnt[37], το BMP[38] και τον TGF- β [39]. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, ότι οστεοαρθρικές μεταβολές στη σύνθεση του χόνδρου και στο φαινότυπο των χονδροκυττάρων συνήθως συνοδεύονται από ανοργανοποίηση του χόνδρου[40].

Η υπερτροφική διαφοροποίηση και η ασβεστοποίηση της εξωκυττάριας ουσίας συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη διαμήκη ανάπτυξη των οστών μέσω της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης στην πλάκα ανάπτυξης.

A.2.2.2 Υπερτροφία των χονδροκυττάρων

Η υπερτροφία των χονδροκυττάρων είναι μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης, ένας βασικός μηχανισμός του σχηματισμού των οστών σε σπονδυλωτά που είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη και την επιδιόρθωση των μακρών οστών. Στον υγιή αρθρικό χόνδρο τα χονδροκύτταρα διατηρούν ένα σταθερό φαινότυπο και αντιστέκονται στο πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Αντίθετα στην οστεοαρθρίτιδα, τα αρθρικά χονδροκύτταρα διαφοροποιούνται και αναπτύσσουν υπερτροφία, συνήθως κοντά στις περιοχές της ανοργανοποιημένης μήτρας του χόνδρου και κοντά σε τοποθεσίες επιφανειακών αλλοιώσεων. Για το λόγο αυτό, έχει θεωρηθεί ότι η οστεοαρθρίτιδα συνδέεται με την επαγωγή της διαφοροποίησης των αρθρικών χονδροκυττάρων[41].

Σε μια πρόσφατη μελέτη του Brew κ.ά.. (2008) αποδείχθηκε αφενός ότι η έκφραση κάποιων χονδροκυττάρων γονιδίων, όπως το Sox-9 και η αγγρεκάνη, μειώθηκαν κατά την πρόοδο της νόσου της οστεοαρθρίτιδας, αφετέρου η έκφραση του κολλαγόνου X δεν αυξήθηκε. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι υπάρχουν αντιφατικά δεδομένα που αφορούν στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα.

Η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων ίη νίνο ελέγχεται από πολλούς παράγοντες που τη ρυθμίζουν[42]. Συστημικές ορμόνες, συμπεριλαμβανομένης της αυξητικής ορμόνης, της ορμόνης του θυρεοειδούς, τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, η βιταμίνη D και τα γλυκοκορτικοειδή ελέγχουν το ρυθμό και την έκταση αυτής της διαδικασίας.

Τοπικοί παραγόμενοι παράγοντες, όπως οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP), το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnts, οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών και των hedgehogs, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την ενδοχόνδρια οστεοποίηση[43,44].

Μερικά από αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης έχουν μια επίδραση στην υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κατά την ΟΑ, όπως η BMP σηματοδότηση[45] το Wnt μονοπάτι[46,47] και το hedgehog μονοπάτι[48]. Μεταξύ αυτών, οι Wnt πρωτεΐνες και οι Frizzled υποδοχείς πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην καταστροφή του χόνδρου καθώς υπερεκφράζονται σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα [49]. Καθώς οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, κάποιες εξωγενείς Wnt πρωτεΐνες φαίνεται να αναστέλλουν άμεσα την αναγέννηση χόνδρου όπως οι Wnt-3a και -7a[50].

Σε μια άλλη μελέτη, η έκφραση του Wnt-5a μπλοκάρει την διαφοροποίηση των αρθρικών χονδροκυττάρων κατά την ανάπτυξη[51], λαμβάνοντας υπόψη ότι η έκθεση σε πρωτεΐνες Wnt-7a προκάλεσε διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων με ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας της β-κατενίνης[52]. Υπάρχουν επίσης αποδείξεις ότι διαφορετικές φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενέχονται στην διαφοροποίηση χονδροκυττάρων. Έτσι, η ιντερλευκίνη (IL)-1β, η οποία μπορεί να παραχθεί σε ασθενείς από φλεγμονώδη κύτταρα, είναι μια σημαντική φλεγμονώδη κυτοκίνη που εμπλέεται στην αποικοδόμηση του χόνδρου και στην αναστολή της σύνθεσης της ECM[53]. Ως συνέπεια, η IL-1β τροποποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας και προωθεί τις φαινοτυπικές αλλαγές στα χονδροκύτταρα. Επιπλέον 2 πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Wnt-7a και Wnt-5a υπερεκφράζονται από την ιντερλευκίνη-1β συμβάλλοντας έτσι στην απώλεια του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων μέσω των κανονικών και μη κανονικών Wnt μονοπατιών[55,56].

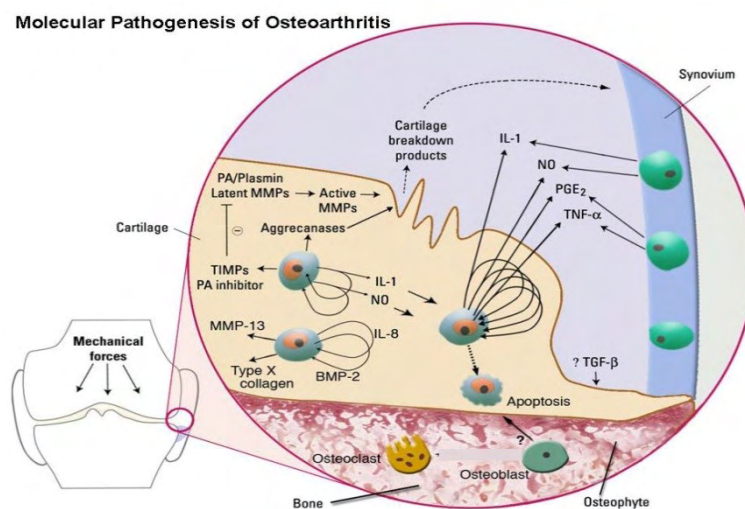
Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο παράγοντας TGF-β τα επίπεδα του οποίου είναι σημαντικά αυξημένα στην οστεοαρθρίτιδα ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης του πλέγματος που οδηγεί σε αποικοδόμηση της μήτρας του χόνδρου. Ο TGF-β επίσης αυξάνει τα εξωκυττάρια PPI του χονδροκύτταρου. Γνωρίζοντας ότι ο TGF-β παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ασβεστοποίηση της μήτρας, θα πρέπει να αναφερθεί ότι και οι δύο κυτοκίνες, IL-1 και ο TGF, ασκούν μια ποικιλία από αντίθετα αποτελέσματα στην ανάπτυξη, την σύνθεση και την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, όπως επίσης και σε άλλες λειτουργίες των χονδροκυττάρων που σχετίζονται με την παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας[57] .

Υπάρχουν δύο πολύ γνωστές οικογένειες πρωτεασών που εμπλέκονται στη βιολογία της εξωκυττάριας ουσίας, η μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας (MMP) και οι ADAMTS οικογένειες. Η MMP-13 εμπλέκεται στην διάσπαση της ινωδομοντουλίνης και του τύπου IX κολλαγόνου και είναι παρόν και ενεργή σε παθολογική κατάσταση του χόνδρου όπως της οστεοαρθρίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η οικογένειες των ADAMTS-4 και ADAMTS-5 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βλάβη του χόνδρου κατά την πρώιμη ΟΑ, οι οποίες διασπούν τις γλυκοζαμινογλυκάνες αλυσίδες που είναι οι

βασικοί παράγοντες για τη διατήρηση της πυκνότητας του φορτίου, το οσμωτικό περιβάλλον και το νερό, λειτουργίες σημαντικές για την διατήρηση των μηχανικών ιδιοτήτων του χόνδρου [58].

Στα πρώτα στάδια της οστεοαρθρίτιδας, η MMP-13 εκφράζεται κυρίως στα κατώτερα ενδιάμεσα και βαθιά στρώματα του ανθρώπινου χόνδρου αλλά και του ποντικού, ενώ οι αγγρικανάσες εκφράζονται στον επιφανειακό χόνδρ[59]. Δεδομένου ότι , ως μη αναστρέψιμο βήμα στην οστεοαρθρίτιδα θεωρείται η καταστροφή του δικτύου κολλαγόνου , η καλλαγενάση -1 ή αλλιώς MMP-1 θεωρείται ως το σημαντικότερο ένζυμο στην εξέλιξη της νόσου . Μαζί με αυτή ένα άλλο προσφάτως ταυτοποιημένο ένζυμο , η κολλαγενάση-3 ή MMP-3 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας. Η κύρια λειτουργία τους είναι η αποικοδόμηση του δικτύου κολλαγόνου (αποτελεί το μη αναστρέψιμο βήμα στην παθογένεια της ΟΑ , ενώ η αποικοδόμηση των πρωτεογλυκανών είναι το πρώιμο βήμα) , αφού είναι οι μόνες που μπορούν να διασπάσουν την τριπλή έλικα κολλαγόνου τύπου II .

Όλες αυτές οι ομάδες ενζύμων που αναφερθήκαν βρίσκονται υπό την ρύθμιση κάποιων ιστικών αναστολέων ειδικών για τις μεταλλοπρωτεϊνάσες , τους TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases) . Έχει δειχθεί ότι και αυτοί διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Οι μοριακοί μηχανισμοί της αναδιαμόρφωσης του χόνδρου κατά τη διάρκεια της ΟΑ αναφέρεται όχι μόνο στις αλλαγές της ECM ή όπως αυτή του δικτύου του κολλαγόνου ή της εναπόθεσης ασβεστίου αλλά και σε αλλαγές στον μεταβολισμό των χονδροκυττάρων.

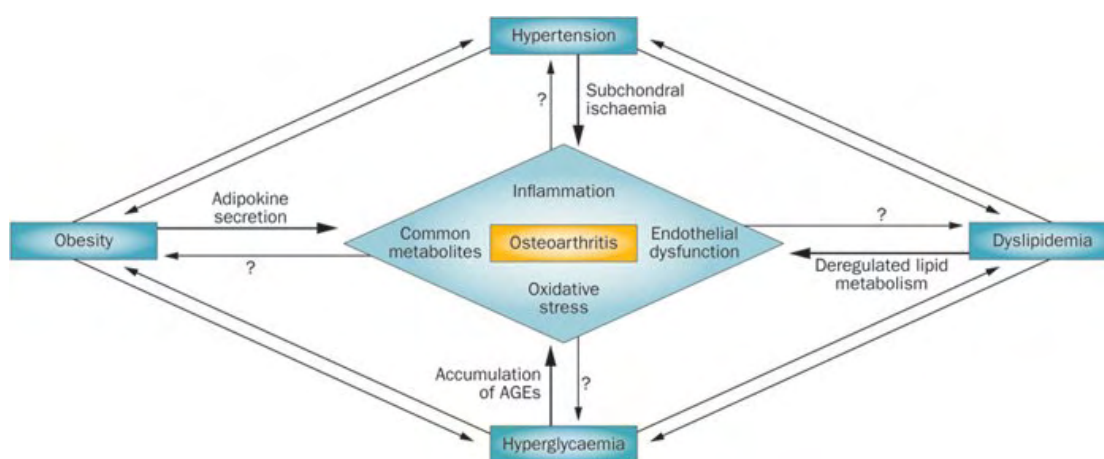


Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών παθολογικών εκδηλώσεων και μερικών από τους πιθανούς στόχους που οδηγούν στην οστεοαρθρίτιδα

Πηγή (www.med.nyu.edu/medicine/labs/abramsonlab/images/fig-1-pathogenesis_osteoarthritis-orig.jpg)

A.3 Το Μεταβολικό Σύνδρομο και η Οστεοαρθρίτιδα

Το μεταβολικό σύνδρομο (ΜΣ) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών ασθενειών. Είναι ένα επικίνδυνο οργανικό σύνδρομο, που χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο επιμέρους μεταβολικών διαταραχών όπως ανοχή στην ινσουλίνη, σπλαχνική παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία και υπέρταση[61]. Επιπλέον το μεταβολικό σύνδρομο επικρατεί στο 59% των ασθενών με ΟΑ και 23% του πληθυσμού χωρίς ΟΑ, σε δεδομένα από ένα δείγμα 7.714 ατόμων που επελέγησαν σε μελέτη στον πληθυσμό των ΗΠΑ και όλων των ηλικιών[62].



Εικόνα 7: Η συσχέτιση μεταξύ της υπέρτασης και της ΟΑ είναι επικεντρωμένη γύρω από την υποχόνδρια ισχαιμία. Η δυσλιπιδαιμία προκαλεί απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού των λιπιδίων σε ιστούς των αρθρώσεων. Η υπεργλυκαιμία συσχετίζεται με την ΟΑ με την υπερβολική εναπόθεση των AGEs και η παχυσαρκία σχετίζεται με τους μεταβολικούς παράγοντες που μεταβάλλουν τα κυκλοφορούντα επίπεδα των αδιποκινών, οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ΟΑ. Η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, διάφοροι μεταβολίτες και η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι παράγοντες που συμβάλλουν στην αιτιολογία της ΟΑ και στο μεταβολικό σύνδρομο. Εκτιμώντας τις πτυχές του Μεταβολικού συνδρόμου, συμβάλλουν σαφώς στην παθογένεια της ΟΑ, ωστόσο, η αμοιβαία επιρροή της ΟΑ για τις άλλες συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου είναι λιγότερο σαφής. (Qi Zhuo, Wei Yang, Jiying Chen & Yan Wang Metabolic syndrome meets osteoarthritis Nature Reviews Rheumatology 8, 729-737 (December 2012))

Η Μεταβολική οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται κυρίως από υπεργλυκαιμία και ορμονικές διαταραχές, εμφανίζεται στα μεσήλικα άτομα (45-65 ετών) και οδηγεί στην οστεοαρθρίτιδα[60]. Μελέτες έχουν επίσης βρεθεί ότι τα άτομα με μεταβολικό σύνδρομο αναπτύσσουν οστεοαρθρίτιδα σε νεαρότερη ηλικία και εμφανίζουν μια πιο γενικευμένη παθολογία όπως αυξημένη φλεγμονή και πιο έντονο πόνο στις αρθρώσεις, σε σύγκριση σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα απουσία του Μεταβολικού συνδρόμου[63,64]. Επομένως οι υποθέσεις και οι αποδείξεις ότι η μεταβολική οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μέρος μιας συστημικής μεταβολικής διαταραχής αυξάνονται.

Υπάρχουν δυο πιθανές εξηγήσεις για την σχέση μεταξύ ΟΑ και υπέρτασης. Πρώτον, η παρουσία της οστεοαρθρίτιδας οδηγεί το άτομο να μειώνει την φυσική του δραστηριότητα προκαλώντας έτσι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) και δευτερον η παχυσαρκία η οποία σχετίζεται με την υπέρταση

αλλά και την οστεοαρθρίτιδα. Μερικές μελέτες έχουν προσπαθήσει να μελετήσουν το μηχανισμό κάτω από τον οποίο βρίσκεται η συσχέτιση μεταξύ της υπέρτασης και της οστεοαρθρίτιδας. Κεντρική θεωρία των ερευνών αυτών είναι η υποχόνδρινη ισχαιμία[65,66]. Η θεωρία αυτή αρχίζει με την υπέρταση που προκαλείται από στένωση των αιμοφόρων αγγείων με τη πάροδο του χρόνου[67] μειώνοντας τη ροή του αίματος και ειδικά στα μικρά υποχόνδρια αγγεία των μακρών οστών. Καθώς αποφράσσεται με στένωση ο αυλός των αγγείων, η ροή του αίματος μπορεί επίσης να μειωθεί με φλεβική απόφραξη ή με ανάπτυξη μικροεμβολών σε υποχόνδρια αγγεία[68]. Δύο είναι τα κύρια επακόλουθα της υποχόνδριας ισχαιμίας που μπορούν να οδηγήσουν στην οστεοαρθρίτιδα. Μια πιθανότητα είναι ότι η υποχόνδρια ισχαιμία θα μπορούσε να θέσει σε κίνδυνο την ανταλλαγή των θρεπτικών συστατικών μεταξύ του αρθρικού χόνδρου και του οστού οδηγώντας έτσι σε εκφυλιστικές αλλαγές στον χόνδρο[69]. Η άλλη πιθανότητα είναι ότι η απόπτωση των οστεοκυττάρων στις ισχαιμικές περιοχές του υποχόνδριου οστού μπορεί να προκαλέσει οστεοκλαστική επαναρρόφηση μειώνοντας την υπερκείμενη οστεώδη στήριξη του χόνδρου[70]. Η τελευταία υπόθεση προκύπτει από τη διαπίστωση της σκλήρυνσης και της αυξημένης πυκνότητας στο υποχόνδριο οστό και το σχηματισμό νέων οστών (με τη μορφή των οστεόφυτων) σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα[71]. Η υπέρταση μπορεί να οδηγήσει σε οστεοκυτταρική απόπτωση όπως διαπιστώνεται σε υπερτασικά μοντέλα αρουραίων όπου αναπτύσσουν οστεονέκρωση ακόμη και με την απουσία της οστεοαρθρίτιδας[71,72].

A.3.1 Οι Δυσλιπιδαιμίες και η οστεοαρθρίτιδα

Επιδημιολογικές μελέτες της δυσλιπιδαιμίας και της οστεοαρθρίτιδας επικεντρώθηκαν αρχικά δείχνοντας ότι τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στον ορό του αίματος είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της οστεοαρθρίτιδας[73]. Μια θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της χοληστερόλης στον ορό του αίματος και της ΟΑ (γόνατο και το χέρι) ανεξάρτητα από την παχυσαρκία έχει αναφερθεί σε μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο[74]. Σε μια άλλη έρευνα βρέθηκε πως η απολιποπρωτεΐνη A1, μία πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων και κύριο συστατικό της HDL που έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια των καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD), εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα σε σύγκριση με τα υγιή άτομα[75]. Έτσι, φαίνεται πιθανό ότι αλλαγές στο μεταβολισμό των λιπιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΑ. Αν και οι ακριβείς λεπτομέρειες των μηχανισμών παραμένουν ασαφείς, μια σειρά από υποτιθέμενες θεωρίες περιγράφουν τη σύνδεση μεταξύ της δυσλιπιδαιμίας και της ΟΑ. Σημαντική συσσώρευση λιπιδίων σε οστεοαρθρικό χόνδρο και ιδιαίτερα στα χονδροκύτταρα, στα αρχικά στάδια της ασθένειας και πριν από τις ιστολογικές αλλαγές[76] δείχνουν ότι αυτή η απόθεση λιπιδίων στην άρθρωση μπορεί να πυροδοτήσει την παθοφυσιολογική διαδικασία της οστεοαρθρικής ανάπτυξης. Επιπλέον, η έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν την πρόσληψη της χοληστερόλης από τα χονδροκύτταρα βρέθηκε να ελαττώνεται σε οστεοαρθρικό χόνδρο[78].

A.3.2 Η παχυσαρκία και η Οστεοαρθρίτιδα

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η οστεοαρθρίτιδα των κάτω άκρων συνδέεται με την παχυσαρκία. Η παρουσία της παχυσαρκίας και τουλάχιστον δύο άλλοι παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου συσχετίστηκαν με υψηλότερο κίνδυνο οστεοαρθρίτιδας γονάτου σε σύγκριση με την παχυσαρκία και μόνο στις γυναίκες[79]

A.4. Η Caveolin – 1

Τα cavinolae αποτελούν εγκοιλώσεις της πλασματικής μεμβράνης του πλάσματος διαμέτρου 50-100nm. Οι εγκοιλώσεις αυτές είναι εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια που βρίσκονται σε αφθονία σε διαφοροποιημένα κύτταρα όπως είναι οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά και τα μυϊκά κύτταρα. Τα cavinolae ενέχονται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες καθώς επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση και την μεταγωγή σήματος[80]. Τα cavinolae μπορεί να λειτουργούν σαν πλατφόρμες σηματοδότησης στην πλασματική μεμβράνη και ενέχονται στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως για παράδειγμα του υποδοχέα της ινσουλίνης[81] και το σηματοδοτικό μονοπάτι του eNOS[82]. Μελέτες έχουν δείξει ότι δυσλειτουργίες των cavinolae σχετίζονται με πληθώρα μεταβολικών διαταραχών οι οποίες συνδέονται με την αθηροσκλήρωση, ανωμαλίες του λιπώδους ιστού, με απορρύθμιση της ενδοθηλιακής οδού του μονοξειδίου του αζώτου, καθώς επίσης και με μειωμένη αγγειογενετική απόκριση και καρδιαγγειακές παθήσεις. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα των cavinolae έχουν οι καβεολίνες οι οποίες αποτελούν δομικές πρωτεΐνες των cavinolae. Η οικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν τις καβεολίνες έχει τρία μέλη τις: caveolin-1, caveolin-2, και caveolin-3. Οι καβεολίνες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, στο σύστημα Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και σε κυστίδια. Η καβεολίνη - 1 (cav-1) εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι τα λιποκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα πνευμονοκύτταρα τύπου I [83], ενώ η καβεολίνη 2 (Cav-2) εντοπίζεται και συν-εκφράζεται με την Cav-1. Το γονίδιο της Cav-2 χαρτογραφείται επίσης στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή όπως της Cav-1 (7q31.1 σε ανθρώπους). Η Caveolin-3 (Cav-3) έχει μεγαλύτερη πρωτεϊνική ομοιότητα αλληλουχίας με την Cav-1 από ότι η Cav-2, αλλά εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των λείων, των σκελετικών και καρδιακών μυοκυττάρων. Η caveolin-1 απαντάται σε δύο ισομορφές: την caveolin-1α η οποία περιέχει κατάλοιπα 1-178 και την caveolin-1β η οποία περιέχει κατάλοιπα 32-178. Η caveolin-1β μεταφράζεται από διαφορετικό mRNA από την caveolin-1α[84]. Η Caveolin-1 έχει βρεθεί να ρυθμίζει τη σηματοδότηση των συνδεδεμένων μορίων με τρεις τρόπους: (α) με άμεση αλληλεπίδραση με το μόριο σηματοδότησης, (β) με διαμερισματοποίηση των πλατφορμών σε περιορισμένες περιοχές της μεμβράνης του πλάσματος ή (γ) με ρύθμιση σηματοδοτώντας την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης με caveolar ενδοκυττάρωση[85]. Είναι ενδιαφέρον ότι το στρες που προκαλείται από την κυτταρική γήρανση ρυθμίζεται αυξητικά από την έκφραση της ενδογενούς caveolin 1[86,87]. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η caveolin 1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην προώθηση του στρες που προκαλείται από την πρόωγη γήρανση.

Πρόσφατες εργασίες δείχνουν ότι η caveolin 1 επάγει πρόωγη κυτταρική γήρανση σε απόκριση προς διάφορες συνθήκες στρες, όπως είναι η ακτινοβολία υν και το οξειδωτικό στρες σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών, και ότι ο φαινότυπος της γήρανσης των ινοβλαστών μπορούν να αντιστραφούν με αναγωγή της caveolin 1[87]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση της caveolin 1 συμμετέχει ενεργά στο στρές που προκαλείται και σχετίζονται με ασθένειες της γήρανσης. Τα μικροσπήλαια είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη και η Cav-1 είναι μία από τις λίγες πρωτεΐνες που δεσμεύει τη χοληστερόλη ισχυρά[88]. Διάφορες κατηγορίες μορίων σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένων των υπομονάδων της G-πρωτεΐνης, τον υποδοχέα τυροσίνης-κινάσης, τα eNOS, και μικρές GTPάσες[89] δεσμεύουν την Cav-1 μέσω της επικράτειας CSD(caveolin-scaffolding domain). Η Cav-1 φαίνεται επίσης να αναστέλλει την ενεργοποίηση και την σηματοδότηση πολλών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της c-Src, της H-Ras, των MAP κινασών και των eNOS[90]. Επίσης διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι γηραιότεροι διπλοειδή ινοβλάστες εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα της caveolin-1 σε σύγκριση με τα νεότερα κύτταρα και ότι η έκφραση caveolin-1 είναι αυξημένη σε γηρασμένα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα καθώς και σε στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών[91]. Επιπλέον, υπερέκφραση της caveolin-1 συσχετίζεται θετικά με βράχυνση της διάρκειας ζωής των χονδροκυττάρων μετά από θεραπεία με ιντερλευκίνη (IL) -1β[92].

A.4.1 Η Caveolin-1 και Ίνωση

Η ίνωση είναι μια παθολογική κατάσταση, όπου οι διαδικασίες που συνήθως συμβαίνουν κατά την επισκευή των ιστών, όπως είναι ο σχηματισμός του συνδετικού ιστού και η συρρίκνωση του τραύματος, εξακολουθούν να υπάρχουν και τελικά να οδηγήσουν σε διαταραχή της φυσιολογικής δομής των ιστών και σε δυσλειτουργία οργάνων. Ο μηχανισμός αυτός δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο το πώς λειτουργεί. Εικάζεται ότι η περίσσεια του αυξητικού παράγοντα TGF-β1 και η αυξημένη ευαισθησία των ινοβλαστών σε αυτόν είναι πιθανές αιτίες της ανθεκτικότητας της διαδικασίας της αναδιαμόρφωσης του ιστού[93]. Ως συνέπεια, οι ινοβλάστες εκφράζουν α-λεϊα ακτίνη μυός(αSMA) όταν διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες. Αυτό οδηγεί σε ένα τύπο κυττάρου, υπεύθυνο για την αυξημένη παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας (ECM) στην επιδιόρθωση των ιστών και της ίνωσης[94]. Μια άλλη κρίσιμη πτυχή στην επιδιόρθωση των ιστών είναι η σωστή και αμφίδρομη σηματοδότηση μεταξύ ινοβλαστών και της εξωκυττάριας ουσίας (ECM)[95]. Κυτταρικές λειτουργίες ζωτικής σημασίας στην αναδιαμόρφωση του ιστού όπως είναι οι λειτουργίες της εξωκυττάριας ουσίας, η έκφραση της αSMA και η απόπτωση, διεξάγονται σύμφωνα με τη σύνθεση και των μηχανικών ιδιοτήτων του περιβάλλοντος της ECM. Υπάρχει ένας αριθμός πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών οδών που στηρίζονται στις κυτταρικές αυτές λειτουργίες φυσιολογικά και είναι σημαντικό να είναι καλά συντονισμένες. Απορρύθμιση σε οποιοδήποτε επίπεδο μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της ομοιόστασης και δυσανάλογη εναπόθεση των συστατικών της ECM και την υπερβολική συσσώρευση του ιστού που οδηγεί σε ίνωση.

Μειωμένη έκφραση της caveolin-1 παρατηρήθηκε στα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα πριν από την επαγωγή της ίνωσης[97].

Επιπλέον, η επανεισαγωγή της caveolin-1 με διάφορα μέσα έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν δραματικά τις αλλαγές στην ίνωση. Ένας αριθμός από μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση της caveolin-1 με τον παράγοντα TGF-β1 στην ίνωση. Σε ασθένειες, όπως αυτές που προαναφέρθηκαν η caveolin-1 δείχθηκε να ρυθμίζεται προς τα κάτω, ενώ ο TGF-β1 ενισχύθηκε[98]. Επίσης έχειδειχθεί ότι η caveolin-1 μπορεί να προκαλέσει μείωση του κολλαγόνου-1 και της ινονεκτίνης, ενώ επίσης προκαλεί αύξηση στην έκφραση mRNA των MMPs.

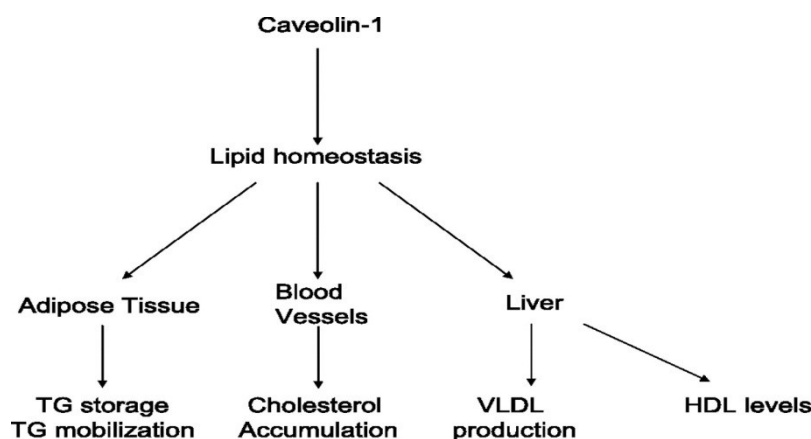
A.4.2 Caveolin-1 και αλληλεπίδραση κυττάρου-ECM

Η caveolin-1 και ειδικώς η φωσφορυλιωμένη μορφή της συμμετέχει στην προσκόλληση των κυττάρων, στην πολικότητα και την κυτταρική μετανάστευση κυρίως μέσω της σύνδεσής της με ιντεγκρίνες καθώς και με τις Rac και Cdc42[99].

Επιπλέον, ένας αριθμός μελετών δείχνουν ότι pY14-Cav1 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση και σταθεροποίηση της κινάσης FAK[100]. Επιπλέον σε γηρασμένους ινοβλάστες υποέκφραση της caveolin-1 αναφέρθηκε να προκαλεί αδρανοποίηση της FAK οδηγώντας σε διάσπαση των συμφύσεων και των ινών της ακτίνης[101]. Έτσι, caveolin-1 είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή διαμόρφωση των συμπλόκων προσκόλλησης κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας και στην φυσιολογική μεταγωγή σήματος στις θέσεις συγκόλλησης αλλά και στην ρύθμιση της FAK.

Ένας βασικός στόχος για τα κύτταρα στην ανάπλαση των ιστών είναι να αντιδρούν κατάλληλα σε ένα ταχέως μεταβαλλόμενο περιβάλλον και ως εκ τούτου, η κύρια πρόκληση στην ίνωση είναι ο ακριβής συγχρονισμός και συντονισμός στην ρύθμιση των διαφόρων διεργασιών σηματοδότησης. Η πλασματική μεμβράνη του πλάσματος μπορεί να θεωρηθεί ως μια πρώτη γραμμή για την υποδοχή και τη μεταγωγή αυτών των διεργασιών. Αυτό θέτει την caveolin-1 ως αναπόσπαστη πρωτεΐνη της μεμβράνης, σε ιδανική τοποθεσία για να επιτελεί τη λειτουργία περί συντονισμού των διαδικασιών και την εξουδετέρωση της κυτταρικής σηματοδότησης στην κυτταρική μεμβράνη.

A.4.3 Η caveolin-1 και πως σχετίζεται με το μεταβολικό σύνδρομο



Εικόνα 8: Ρόλος των caveolin-1 στη ρύθμιση της λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών του μεταβολισμού[102]

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου και του μεταβολικού συνδρόμου. Η καλή κατανόηση των παραγόντων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των διαφόρων λιποπρωτεϊνών είναι επομένως και το κλειδί για την καλύτερη κατανόηση των μεταβλητών που σχετίζονται με την ανάπτυξη αυτών των ασθενειών. Μεταξύ των παραγόντων που εντοπίστηκαν, η caveolin 1 έχειδειχθεί ότι παίζει έναν ρόλο κλειδί στην ρύθμιση αρκετών οδών κυτταρικής σηματοδότησης και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Παρατηρήθηκε λοιπόν σε μια μελέτη ότι ενώ σε Cav-1 (- / -) ποντίκια εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, εμφανίζουν επίσης μειωμένη ηπατική πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (VLDL). Επιπλέον, βρέθηκε επίσης ότι ανεπάρκεια της caveolin-1 σχετίζεται με την αύξηση της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL). Τέλος, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ανεπάρκεια της caveolin-1 εμποδίζει την διακυττάρωση της LDL μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, και ως εκ τούτου, η caveolin-1 μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της LDL στο πλάσμα. Λαμβανόντας υπόψιν τα παραπάνω οι μελέτες υποδεικνύουν ότι caveolin-1 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών με τον έλεγχο των επιπέδων στο πλάσμα τους, καθώς και στην σύνθεση των λιπιδίων τους. Έτσι caveolin-1 μπορεί επίσης να διαδραματίσει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης[102].

Σε μια άλλη μελέτη προτείνουν μια μάλλον περίπλοκη, είτε προαρτηριογόνο ή αντιαρτηριοσκληρωτική δράση της καβεολίνης-1 ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου που εξέτασαν. Συγκεκριμένα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα η caveolin-1 και τα cavinolae μπορεί να παίζουν ένα ρόλο προαρτηριογόνο προωθώντας την διακυττάρωση των σωματιδίων της LDL-χοληστερόλης από το αίμα στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Αντίθετα, σε λεία μυϊκά κύτταρα η ικανότητα της caveolin-1 να ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (υπερπλασία εσωτερικού χιτώνα των αγγείων) μπορεί να έχει μία αντιαρτηριοσκληρωτική δράση[103]

A.4.4 Η Caveolin-1 και η οστεοαρθρίτιδα

Η Αρθρική γήρανση των χονδροκυττάρων πιστεύεται ότι συνεισφέρει στην αυξημένη επίπτωση της οστεοαρθρίτιδας με την πάροδο της ηλικίας και καταβολικές καταπονήσεις όπως οι κυτοκίνες και το οξειδωτικό στρες έχουνδειχθεί ότι διαμεσολαβούν στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας[105]. Είναι ενδιαφέρον ότι αμφότερα οι IL-1β και το υπεροξειδίο του υδρογόνου προκαλούν αύξηση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της caveolin-1 mRNA και της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να προκαλείται πρόωρη γήρανση σε αρθρικά χονδροκύτταρα. Μείωση της έκφρασης της caveolin-1 με antisense ολιγονουκλεοτίδια εμποδίζει σημαντικά την επαγωγή του γηρασμού των χονδροκυττάρων που επάγεται από την IL-1β και το υπεροξειδίο υδρογόνου, υποδεικνύοντας ότι caveolin-1 μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας μεσολαβώντας στην γήρανση των χονδροκυττάρων[106]. Μελέτη σε οστεοαρθριτικό αρθρικό χόνδρο ανθρώπων και ποντικού βρέθηκε ότι η caveolin 1 σχετίζεται θετικά με την εκφύλιση του χόνδρου. Τόσο η IL-1β όσο και το υπεροξειδίο του αζώτου (H₂O₂) αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της

caveolin 1 καθώς επίσης των πρωτεϊνικών επιπέδων με αποτέλεσμα να προκαλείται έντονη έκφραση των γηρασμένων φαινοτύπων όπως αλλοιωμένη κυτταρική μορφολογία, διακοπής της κυτταρικής ανάπτυξης, διάβρωση των τελομερών και γήρανση που σχετίζεται με την β-γαλακτοσιδάση. Η υπερέκφραση της caveolin 1 που προκαλείται με την ενεργοποίηση της p38 MAPK είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα των χονδροκυττάρων να παράγουν κολλαγόνο τύπου II και αγγρεκάνη. Αντιθέτως, μειωμένη έκφραση της caveolin 1 με antisense ολιγονουκλεοτίδιο ανέστειλε σημαντικά τα χαρακτηριστικά της γήρανσης των χονδροκυττάρων που επάγεται από καταβολικές παράγοντες[107]. Επαγωγή της Caveolin 1 και αυξημένη έκφραση των p53 και p21 από την IL-1β και το υπεροξείδιο του αζώτου(H₂O₂) και μειώνοντας την έκφραση του φωσφορυλιωμένου ρετινοβλαστώματος (Rb) είναι ένα γεγονός που υποδηλώνει ότι το p53 / p21 / Rb μονοπάτι φωσφορυλίωσης καθώς και παρατεταμένη ενεργοποίηση της p38 MAPK, μπορεί να μεσολαβήσει στην γήρανση των χονδροκυττάρων που προκαλείται από το στρες. Τα ευρήματά αυτά υποδεικνύουν ότι η IL-1β και το οξειδωτικό στρες επάγουν τα χαρακτηριστικά της πρόωρης γήρανσης σε χονδροκύτταρα της οστεοαρθρίτιδας, με τη μεσολάβηση, τουλάχιστον εν μέρει, από το στρες που προκαλείται από την έκφραση της caveolin 1. Αυτό υποδεικνύει ότι caveolin 1 παίζει ένα ρόλο στην παθογένεση της οστεοαρθρίτιδας μέσω προώθησης της μειωμένης έκφρασης των χονδροκυττάρων.

A.5 Πολυμορφισμοί

Το ανθρώπινο DNA διαφέρει σε συγκεκριμένες θέσεις μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού (εξάίρεση αποτελούν οι μονοωογενείς διδύμοι). Σε πολλές, μη κωδικοποιημένες συνήθως περιοχές του γονιδιώματος (γενετικοί τόποι) είναι δυνατόν να υπάρχουν πολλαπλά φυσιολογικά αλληλόμορφα. Οι διαφορετικοί γονότυποι εξαιτίας της ύπαρξης πολλών αλληλομόρφων ονομάζονται πολυμορφισμοί του DNA. Οι κυριότεροι πολυμορφισμοί του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι: Πολυμορφισμοί στο επίπεδο του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) Μικρο-δορυφόροι ή αλληλουχίες με σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις (Microsatellites ή Short Tandem Repeats, STRs) μίνι-δορυφόροι ή αλληλουχίες με ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (Minisatellites ή Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs). SNPs σε μια συγκεκριμένη θέση ενός ομόλογου ζεύγους χρωμοσωμάτων (γενετικός τόπος) μπορεί να υπάρχει διαφορά ενός μόνο νουκλεοτιδίου (π.χ. σε ορισμένα άτομα να υπάρχει αδερίνη ενώ σε άλλα γουανίνη). Αυτή η διαφορά οδηγεί στην παρουσία 2 αλληλομόρφων στον πληθυσμό (A και G) από τα οποία προκύπτουν 3 γονότυποι (π.χ. ομοζυγωτία AA, ετεροζυγωτία AG, ομοζυγωτία GG) Υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει ~1 SNP σε κάθε 1000 βάσεις. Γενικά Οι πολυμορφισμοί αξιοποιούνται στη γενετική ανάλυση (σύνδεση με νοσήματα όπως διάφορες μορφές καρκίνου, κατασκευή γενετικών χαρτών κ.α.). Γενετικό αποτύπωμα (genetic fingerprinting, DNA typing, DNA profiling) είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για την διάκριση ατόμων με βάση την ανάλυση του DNA τους. Παρόλο που η αλληλουχία DNA δύο διαφορετικών ατόμων είναι περίπου ίδια, είναι εξαιρετικά σπάνιο δύο άνθρωποι που δεν έχουν εξ' αίματος συγγένεια να

έχουν τα ίδια ακριβώς αλληλόμορφα σε πολλαπλούς πολυμορφικούς γενετικούς τόπους. Όσο περισσότερες πολυμορφικές θέσεις χρησιμοποιηθούν στην γενετική ανάλυση τόσο μεγαλύτερη και η πιθανότητα ο ανιχνευόμενος συνδυασμός να διακρίνει ένα συγκεκριμένο και μοναδικό άτομο. Οι συνδυασμοί πολυμορφισμών ακολουθούν τον μενδελικό τρόπο κληρονομικότητας. Κάθε άτομο διαθέτει σχεδόν μοναδικό συνδυασμό, άρα έχει και ένα μοναδικό γενετικό αποτύπωμα. Για να θεωρείται πολυμορφικός ένας γενετικός τόπος πρέπει το λιγότερο συχνό αλληλόμορφό του να έχει συχνότητα τουλάχιστον 1% στον πληθυσμό. SNPs δεν εντοπίζονται απαραίτητα μέσα σε γονίδια και ως εκ τούτου δεν επηρεάζουν πάντα τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Χωρίζονται σε 2 διακριτές κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αυτά που δεν εντοπίζονται μέσα σε γονίδια όπως για παράδειγμα περιοχές μεταξύ των γονιδίων και δεν επιδρούν στη λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει SNPs, τα οποία δεν εντοπίζονται μέσα σε γονίδια όπως για παράδειγμα περιοχές μεταξύ των γονιδίων και δεν επιδρούν στη λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος. Τα πρώτα εντοπίζονται μέσα στην κωδική περιοχή ενός γονιδίου και διακρίνονται σε συνώνυμα (synonymous, όταν η μονονουκλεοτιδική αλλαγή δεν οδηγεί σε αλλαγή αμινοξικού καταλοίπου) και σε μη-συνώνυμα (non-synonymous, όταν αλλάζει η αμινοξική αλληλουχία). Τα μη κωδικοποιούντα εντοπίζονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου (ιντρόνια, περιοχή υποκινητή, 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές) και αλλάζουν το επίπεδο της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και ως εκ τούτου πόσο RNA και πρωτεΐνη χρειάζονται[108]. SNPs που εντοπίζονται στην κωδική περιοχή γονιδίων δύναται να τροποποιήσουν την αμινοξική αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης, μέσω μη συνώνυμων αλλαγών[109]. Αυτές οι αλλαγές με τη σειρά τους, πιθανόν να έχουν αντίκτυπο στη δομή και τη λειτουργία του εκάστοτε πρωτεϊνικού προϊόντος. SNPs που βρίσκονται σε αμετάφραστες περιοχές, επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση με το επηρεάζουν ρυθμιστικά στοιχεία ή τη σταθερότητα του mRNA[110]. Η 5' UTR καθίσταται σημαντική καθώς περιέχει στοιχεία τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφή (π.χ μέσω μεθυλίωσης), τη μετάφραση αλλά και τη σταθερότητα του mRNA. Εξίσου σημαντική με την 5'UTR, φαίνεται να είναι να είναι και η 3'UTR, όσον αφορά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

A.5.1 Η Caveolin-1 και πολυμορφισμοί σε διάφορες παθήσεις

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι ο πολυμορφισμός 1132T> C του γονιδίου NOS3 συνδέθηκε με το μεταβολικό σύνδρομο (MS) σε υπερτασικούς ασθενείς. Σε μια μελέτη που διεξάχθηκε υποβλήθηκαν σε γονοτυπική ανάλυση 285 τυχαία επιλεγμένα άτομα και 175 υπερτασικοί ασθενείς με δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου CAV1: το 22285 C> T και το 22375 με 22375 del AC, και το 1132T> C πολυμορφισμός του γονιδίου NOS3. Ο 22285 C-22375-22375 del (Cd) απλότυπος του γονιδίου CAV1 συνδέθηκε με τα χαμηλά επίπεδα της πίεσης του αίματος στο γενικό πληθυσμό. Επιπλέον, ήταν ένας γενετικός παράγοντας προστασίας κατά του μεταβολικού συνδρόμου σε υπερτασικούς ασθενείς.

Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με τα κανάλια καλίου Kir2.1, KCNH2, και HCN4 και τα κανάλια νατρίου Nav1.5 και Nav1.8 και γίνεται ένα ισχυρό υποψήφιο γονίδιο ευαισθησίας για κολπική μαρμαρυγή σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες[111]. Γενετικοί πολυμορφισμοί της Cav-1, G14713A και T29107A ενδέχεται να επηρεάσουν την ευαισθησία ενός ατόμου στην ανάπτυξη ESCC, καθιστώντας τους ως γενετικούς δείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση του οισοφαγικού καρκινώματος πλακώδους κυττάρου (ESCC). Άλλη ερευνητική ομάδα μελέτησε το A αλληλόμορφο της Cav-1 του πολυμορφισμού G14713A ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πρώιμο δείκτη για την ανίχνευση της σαρκοπενίας. Τέλος, παραλλαγές στο γονίδιο της Cav-1 σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την υπέρταση. Έτσι πολυμορφισμοί του γονιδίου της καβεολίνης 1 μπορεί να είναι βιολογικοί δείκτες για την αντίσταση στην ινσουλίνη και την υπέρταση, επιτρέποντας την έγκαιρη ανίχνευση και την βελτίωση των στρατηγικών θεραπειών[112]

A.6 Σκοπός

Η καβεολίνη 1 είναι μία πρωτεΐνη της οικογένειας των καβεολινών όπου τα επίπεδα έκφρασή της φαίνεται να παίζουν ρόλο στην παθογένεια διαφόρων νόσων ωστόσο παραμένει ακόμη άγνωστος ο ρολός της και ο μηχανισμός δράσης την αιτιοπαθογένεια της οστεοαρθρίτιδας. Σκοπός της ερευνάς μας είναι να διερευνήσουμε τον ρόλο της καβεολίνης 1 στην οστεοαρθρίτιδα μελετώντας τον πολυμορφισμό rs8713 με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Στην μελέτη συμμετείχαν ασθενείς διαγνωσμένοι με οστεοαρθρίτιδα και άτομα που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν :

- ❖ η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων AA, AC και CC του SNP (rs8713) στα άτομα της ομάδας ελέγχου και σε αυτά της ομάδας μελέτης
- ❖ η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων A και C του SNP (rs8713) στα άτομα της ομάδας ελέγχου και σε αυτά της ομάδας μελέτης

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1 Πληθυσμιακό δείγμα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα, το οποίο ελήφθη από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Στην διαδικασία συλλογής δειγμάτων συμπεριελήφθησαν 279 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος λόγω πρωτοπαθούς ΟΑ και 254 ασθενείς – χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων- με σοβαρά κατάγματα ή ακρωτηριασμούς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χονδροδυσπλασία, ΟΑ μετά από σηπτική αρθρίτιδα και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

B.1.2 Επιλογή του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού του γονιδίου της caveolin 1 (rs8713)

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου της καβεολίνης 1 με την οστεοαρθρίτιδα. Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην ανίχνευση SNPs σε διάφορες περιοχές του συγκεκριμένου γονιδίου, μεταξύ των οποίων και στην 3'UTR του, εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζει αυτή η περιοχή στην σταθερότητα του μεταγράφου αλλά και στη μετάφραση μέσω διαφόρων επιδράσεων στην πολυαδενυλίωση και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-mRNA και miRNA-mRNA. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία το ενδιαφέρον εστιάστηκε στην ανεύρεση SNP στην 3'UTR της CAV1 και στη συσχέτισή του με την οστεοαρθρίτιδα. Σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων για SNPs (dbSNP) του Εθνικού Κέντρου για Πληροφορίες Βιοτεχνολογίας (National Center for Biotechnology Information- NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) ,προκύπτει ότι υπάρχουν συνολικά 1973 SNPs σε διάφορες περιοχές του γονιδίου CAV1. Από αυτούς, οι 121 βρίσκονται στην 3'UTR. Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου προς μελέτη μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων μας, έγινε βάσει της συχνότητας του πιο σπάνιου αλληλομόρφου (Minor Allele Frequency- MAF), η οποία προτιμάται να είναι μεγαλύτερη του 0,05 και να μην είναι πολύ συχνό στον πληθυσμό συνυπολογίζοντας πάντα τον αριθμό των ατόμων που μελετήθηκαν.

Με βάση τα κριτήρια αυτά, καταλήξαμε στον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό με rs8713, ο οποίος εντοπίζεται στην 3'UTR της CAV1. Τα πολυμορφικά αλληλόμορφα είναι τα A και C, με το C να εμφανίζεται με τη μικρότερη συχνότητα στους Ευρωπαίους (MAF: C=0,1647/825).

B.1.3 Απομόνωση του DNA από περιφερικό αίμα

Προετοιμασία :

Διατηρούμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου

Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 70⁰ C

Βεβαιωνόμαστε ότι τα διαλύματα (buffers): binding buffer, inhibitor removal buffer, wash buffer, elution buffer, η πρωτεϊνάση K και η ισοπραπονόλη είναι έτοιμα διαθέσιμα.

Συγκεκριμένα θερμαίνουμε το elution buffer στο υδατόλουτρο στους 70⁰ C

Τα binding buffer, inhibitor removal buffer, wash buffer και η ισοπραπονόλη διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου

Η πρωτεΐνωση K διατηρείται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από -15⁰ C μέχρι -25⁰ C και περιμένουμε να ξεπαγώσει και έπειτα την προσθέτουμε στο δείγμα μας.

Πρωτόκολλο

- Σε καθένα από τα eppendorfs του 1.5 ml τοποθετούμε περιφερικό αίμα 200μl.
- Έπειτα προσθέτουμε το Binding buffer 200 μl. Το διάλυμα αυτό επιτυγχάνει τη λύση των κυττάρων ώστε να απελευθερωθεί το DNA
- Προσθέτουμε πρωτεΐνωση K 40 μl σε κάθε eppendorf και τα ανακινούμε στο vortex. Η πρωτεΐνωση K χρησιμοποιείται για την καταστροφή των πρωτεϊνών και την απελευθέρωση του DNA
- Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 70⁰C για 10 λεπτά για να επιδράσει η πρωτεΐνωση K.
- Προσθέτουμε σε κάθε eppendorf ισοπροπανόλη 100 μl. Η προσθήκη αυτή βοηθάει στην κατακρήμνιση του DNA.
- Προσεχτικά μεταφέρουμε το μείγμα σε High Pure filter tube, κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε στους 25⁰C για 1 λεπτό στις 8.000 στροφές. Τοποθετούμε το φίλτρο σε καθαρό tube και πετάμε το παλιό.
- Προσεχτικά ανοίγουμε τη στήλη και προσθέτουμε inhibitor removal buffer 500μl για να δεσμεύσει το DNA στο φίλτρο σιλικόνης. Φυγοκεντρούμε στους 25⁰C για 1 λεπτό στις 8.000 στροφές. Τοποθετούμε το φίλτρο σε καθαρό tube και πετάμε το παλιό.
- Ανοίγουμε με προσοχή τη στήλη και προσθέτουμε wash buffer 500μl για το καθαρισμό του DNA. Φυγοκεντρούμε στους 25⁰C για 1 λεπτό στις 8.000 στροφές. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό eppendorf 1.5 ml και πετάμε το παλιό. Ανοίγουμε τη στήλη, προσθέτουμε elution buffer 200μl, φυγοκεντρούμε και τέλος πετάμε το φίλτρο και κρατάμε το απομονωμένο DNA.

B.1.4 Ηλεκτροφόρηση

- Παρασκευή 1% ηλεκτρώματος αгарόζης
- Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε την αντίστοιχη ποσότητα αгарόζης 1.5 γραμ. και ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE 150 ml.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε 8μl βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει.

- Ρίχνουμε το διάλυμα στη συσκευή αγαρόζης αφού έχουμε τοποθετήσει κάθετα στην κατάλληλη θέση τη χτένα που θα δημιουργήσει θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αγαρόζη.
- Όταν πήξει η αγαρόζη (χρειάζεται 30 λεπτά περίπου) αφαιρούμε προσεχτικά τη χτένα και το gel είναι έτοιμο προς ηλεκτροφόρηση.
- Βυθίζουμε το πήκτωμα αγαρόζης μέσα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα DNA 5 μl και το διάλυμα χρωστικής 5 μl και ηλεκτροφορούμε.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός παρατηρούμε την έκφραση του DNA στο gel.

B.1.5 Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου

Διαδικασία διαχωρισμού αλληλομόρφων

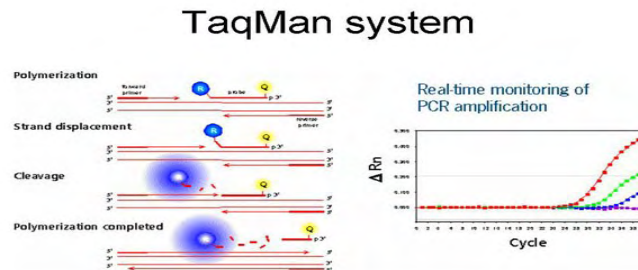
Η δοκιμασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων είναι μια πολλαπλή δοκιμασία τελικού σημείου (τα δεδομένα συλλέγονται και αναλύονται στο τέλος της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου- RT-PCR), η οποία χρησιμεύει προκειμένου να καθοριστεί ο γονότυπος μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου. Η παρουσία δύο ζευγών εκκινητών/ανιχνευτών σε κάθε αντίδραση επιτρέπει τη γονοτύπηση των δύο πιθανών παραλλαγών ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού που εντοπίζονται σε μία συγκεκριμένη θέση στην αλληλουχία-στόχο.

Στη διαδικασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων, για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται ένα μοναδικό ζεύγος ανιχνευτών προς μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της υπο μελέτη πολυπορφικής θέσης στόχο. Ο ένας ανιχνευτής ταιριάζει απόλυτα με το αλλήλιο 1 και ο άλλος είναι απόλυτα ειδικός για το αλλήλιο 2. Η διαδικασία διαχωρισμού αλληλομόρφων βασίζεται στη χημεία της φθορίζουσας 5' νουκλεάσης (αλλιώς γνωστή ως TaqMan® probe-based chemistry) καθώς οι φθορίζουσες χρωστικές είναι συνδεδεμένες στο 5' άκρο του ανιχνευτή (probe) ειδικού για το κάθε αλλήλιο. Οι ανιχνευτές και οι εκκινητές επελέχθησαν σύμφωνα με το TaqMan® SNP Genotyping Assays.

Στη διαδικασία διαχωρισμού των αλληλομόρφων, η PCR περιλαμβάνει έναν ειδικό, φθορίζον και σημασμένο με χρωστική ανιχνευτή. Στη παρούσα διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο TaqMan® MGB ανιχνευτές σημασμένοι με διαφορετικές χρωστικές αναφοράς (ο ένας σημασμένος με τη φθορίζουσα χρωστική VIC® και ο άλλος με τη FAM™) προκειμένου να διαφοροποιηθεί η ενίσχυση κάθε αλληλομόρφου και να υπολογιστεί η αλλαγή στο φθορισμό των χρωστικών (VIC® και AM™) που σχετίζονται με τους ανιχνευτές (probes). Ο κάθε ανιχνευτής (probe) διαθέτει επίσης και μία μη φθορίζουσα χρωστική στο 3' άκρο (Non-fluorescent quencher-NFQ). Κατά τη διάρκεια της PCR κάθε ανιχνευτής υβριδοποιείται ειδικά στις συμπληρωματικές αλληλουχίες ανάμεσα στις θέσεις οι οποίες έχουν οριστεί από τους εκκινητές. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται (AmpliTaq Gold DNA Polymerase), αφαιρεί τη φθορίζουσα χρωστική μόνο από αυτούς τους ανιχνευτές που υβριδοποιήθηκαν με τις αλληλουχίες που περιέχουν τα πολυμορφικά αλληλόμορφα.

Αυτή η αφαίρεση έχει σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί το σήμα φθορισμού της εκάστοτε χρωστικής. Το αποτέλεσμα είναι το σήμα φθορισμού που ενισχύεται από την PCR να υποδεικνύει τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε κάθε δείγμα γενωμικού DNA.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή 7900HT Fast Real-Time PCR System και η διάκριση των αλληλομόρφων πραγματοποιήθηκε στο 7900HT Fast System σε 384 –well reaction plate.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση real time PCR με Taqman αφετηρίες

Πειραματική διαδικασία

Αφού σχεδιαστεί η πειραματική διαδικασία για τη διάκριση αλληλίων και προετοιμαστούν τα δείγματα DNA, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί

- Μια διαδικασία ενίσχυσης (amplification run), χρησιμοποιώντας το Standard Curve (AQ) plate document, προκειμένου να δημιουργηθούν τα δεδομένα της
- Μια διαδικασία διάκρισης των αλληλομόρφων (allelic discrimination run), χρησιμοποιώντας το Allelic Discrimination plate document, το οποίο είναι ένα SDS λογισμικό βάσει του οποίου θα αναλυθούν τα δεδομένα της real time PCR.

Προετοιμασία δειγμάτων:

Αφού απομονώθηκε το DNA από το περιφερικό αίμα σύμφωνα με το προηγούμενο πρωτόκολλο, υπολογίζουμε τον αριθμό των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν και τον όγκο των συστατικών που χρειάζονται για όλα τα πηγαδάκια του reaction plate και ετοιμάζουμε το διάλυμα της αντίδρασης (mix), το οποίο για κάθε δείγμα περιέχει:

- Master mix : Taqman Genotyping Master Mix (AB applied Biosystem) 2.50 μl
- Taqman Snp Genotyping Assays CAV1 snp rs8713 (AB applied Biosystem) 0.25μl Συνολικά 2.75μl

Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος είναι τα 5μl, οπότε στα 2.75 μl του διαλύματος αντίδρασης που έχουμε προσθέσει σε κάθε πηγαδάκι, προσθέτουμε 2.25μl δείγματος DNA

B.1.6 Στατιστική ανάλυση:

Για την κατανομή των γονοτύπων, και τη συχνότητα εμφάνισης των χρησιμοποιήσαμε το χ^2 test. Στατιστιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με $p < 0.05$. Για την στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής SPSS Statistics 20.

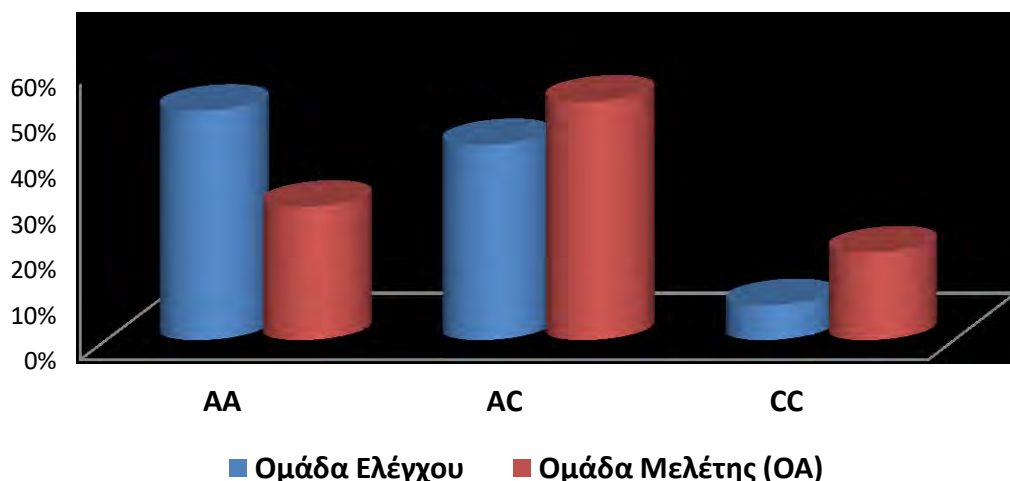
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελέτη συσχέτισης : ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) rs8713 του γονιδίου της **caveolin-1** σχετίζεται με την εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας.

Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs8713 με MAF/MinorAlleleCount: C=0.1647/825 και τον κίνδυνο για εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση και βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης του ετερόζυγου (AC) γονοτύπου ($p=0,029$, OR=1,463) μεταξύ των ατόμων με ΟΑ και των ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης του ομόζυγου (CC) γονοτύπου ($p=0,001$, OR=2,901) μεταξύ των ατόμων με ΟΑ και των ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.. Στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για την συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων Α και C και παρατηρήθηκε στατιστικά αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου στους ΟΑ ασθενείς συγκριτικά με τα άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. ($p=0,001$, OR=2,027).

CAV 1 –rs8713 γονότυποι	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ Αριθμός δειγμάτων (n=254)	ΟΣΤΕΑΡΘΡΙΤΙΚΑ Αριθμός δειγμάτων (n=279)	Pvalue	OR(95%CI)
AA	127(50%)	81(29%)		
AC	108(42.5%)	145(52%)	0.029	1.463 (1,039-2,060)
CC	19(7.5%)	53(19%)	0,001	2,901 (1,665-5,053)

Πίνακας 1: Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού με rs8713 του γονιδίου της καβεολίνης-1 στους ΟΑ ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου

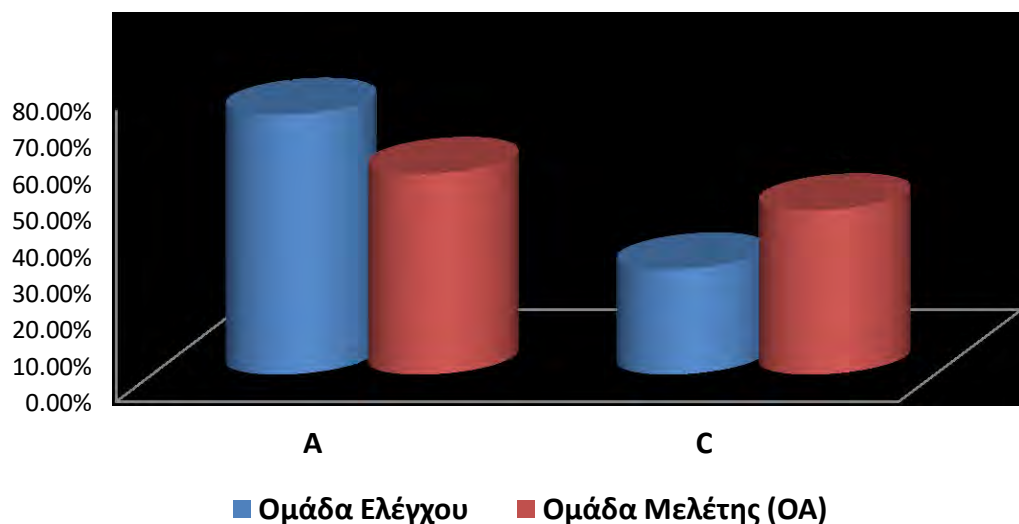


Στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή του ετερόζυγου (AC) γονοτύπου ($p=0,029$, OR=1,463) μεταξύ των ατόμων της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή του ομόζυγου (CC) γονοτύπου ($p=0,001$, OR=2,901) μεταξύ των ατόμων της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου.

ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ Αριθμός δειγμάτων (n=508)	ΟΣΤΕΑΡΘΡΙΤΙΚΑ Αριθμός δειγμάτων (n=558)	Pvalue	OR(95%CI)
A	362 (71,25%)	307(55%)	0,001	2,027 (1,572-2,615)
C	146 (28,75%)	251(45%)		

Πίνακας 2: Κατανομή των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού με rs8713 του γονιδίου της καβεολίνης-1 στους ΟΑ ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου



Στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή του σπάνια εμφανιζόμενου αλληλομόρφου (C) ($p=0,001$, $OR=2,027$) μεταξύ των ατόμων της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου.

B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), είναι γνωστή ως εκφυλιστική αρθρίτιδα ή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων. Αποτελεί την πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων η οποία επηρεάζει περίπου το 10% του παγκόσμιου πληθυσμού [112]. Η ΟΑ μπορεί να προσβάλλει οποιαδήποτε άρθρωση του σώματος, αλλά πιο συχνά επηρεάζει τα γόνατα, τα ισχία και τα χέρια. Παράγοντες κινδύνου όπως η παχυσαρκία, οι μεταβολικές ασθένειες, η μεγάλη ηλικία, το φύλο, η φυλή, η γενετική προδιάθεση, η διατροφή, το κάπνισμα, η πυκνότητα των οστών και η λειτουργία των μυών σχετίζονται με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας. Γενετικοί παράγοντες, μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου[27]. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εμφάνιση και εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας. Ποικίλες μελέτες συσχέτισης έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στον Ευρωπαϊκό όσο και στον Ασιατικό πληθυσμό και έχουν αναδείξει γονίδια που αυξάνουν την προδιάθεση για εμφάνιση και εξέλιξη της ΟΑ, πολλά από τα οποία εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ευθύνονται για το σχηματισμό των δομών της άρθρωσης και τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας τους. Η πλειονότητα όμως των αναφερθέντων συσχετίσεων μπορεί να παρέχει ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω του μικρού αριθμού των εξεταζόμενων δειγμάτων, της μη επαναληψιμότητας της μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ή σε διαφορετικό πληθυσμό και του καθορισμού χαμηλότερου ορίου σημαντικότητα.

Στη παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τη συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού με rs8713 στο γονίδιο CAV1, με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Οι καβεολίνες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, στο σύστημα Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και σε κυστίδια. Η καβεολίνη - 1 (cav-1) εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι τα λιποκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα πνευμονοκύτταρα τύπου I [83]. Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι caveolin-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών με τον έλεγχο των επιπέδων στο πλάσμα τους, καθώς και στην σύνθεση των λιπιδίων τους. Έτσι caveolin-1 μπορεί επίσης να διαδραματίσει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης[103] όπως και του μεταβολικού συνδρόμου. Μείωση της έκφρασης της caveolin-1 με antisense ολιγονουκλεοτίδια εμποδίζει σημαντικά την επαγωγή της γήρανσης των χονδροκυττάρων που επάγεται από την IL-1β και το υπεροξειδίο υδρογόνου [106]. Μελέτη σε οστεοαρθρικό αρθρικό χόνδρο ανθρώπων και ποντικού έδειξε ότι η caveolin 1 σχετίζεται θετικά με την εκφύλιση του χόνδρου. Πολυμορφισμοί της καβεολίνης -1 φαίνεται να συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια και να σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την υπέρταση καθώς επίσης και σε διάφορες μορφές καρκίνου όπως καρκίνο του προστάτη και καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα μια ιαπωνική μελέτη ανέφερε ότι μέχρι 16% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού παρουσιάζουν μια σποραδική μετάλλαξη στο γονίδιο της ανθρώπινης Cav1, συγκεκριμένα στοP132L[125].

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συσχέτισης, έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης του ετερόζυγου (AC) γονοτύπου μεταξύ των ατόμων με ΟΑ και των ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε και στην συχνότητα εμφάνισης του ομόζυγου (CC) γονοτύπου μεταξύ των ατόμων με ΟΑ και των ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου στους ΟΑ ασθενείς συγκριτικά με τα άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι τα άτομα που έφεραν το C αλληλόμορφο (είτε σε ετερόζυγη είτε σε ομόζυγη μορφή) του SNP με rs8713, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση οστεοαρθρίτιδας. Παρέχονται τα πρώτα δεδομένα για την πιθανή εμπλοκή του γονιδίου της CAV1 στην ΟΑ μέσω της παρούσας μελέτης συσχέτισης. Η γονοτύπηση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων όπως επίσης και η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της CAV1 αλλά και των μοριακών μηχανισμών στους οποίους είναι πιθανό να εμπλέκεται, θα βοηθήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με την ακριβή εμπλοκή της στην παθοφυσιολογία της νόσου.

1. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461–8.
2. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med*. 2005;33(2):295–306
3. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461–8
4. Buckwalter, J.A., J.A. Martin, and T.D. Brown, Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology* 2004; 41(3-4):593-6
5. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med*. 2005;33(2):295–306
6. Hunziker, E.B., T.M. Quinn, and H.J. Hauselmann, Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002; 10(7): 564-72, 2002
7. Eggli PS, Herrmann W, Hunziker EB, Schenk RK. Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. *Anat Rec*. 1985;211:246-257
8. Szirmai JA. *Structure of cartilage*. In: Engel A, Larsson T, editors. eds. *Aging of Connective and Skeletal Tissue*. Stockholm, Sweden: Nordiska; 1969:163-200
9. Mow VC, Guo XE. *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;4:175-209
10. Szirmai JA. *Structure of cartilage*. In: Engel A, Larsson T, editors. eds. *Aging of Connective and Skeletal Tissue*. Stockholm, Sweden: Nordiska; 1969:163-200
11. Buckwalter JA, Rosenberg LA, Hunziker EB. *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*. New York, NY: Raven Press; 1990
12. (Heinegard, D., *Proteoglycans and more--from molecules to biology*. *Int J Exp Pathol*, 2009; 90(6): 575-86
13. (Heinegard, D., *Proteoglycans and more--from molecules to biology*. *Int J Exp Pathol*, 2009; 90(6): 575-86
14. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage, part 1: tissue design and chondrocyte-matrix interaction. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79:600-611
15. Pereira D, Peleteiro B, Araujo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. *The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review*. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(11):1270–85
16. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. *Epidemiology and burden of osteoarthritis*. *Br Med Bull*. 2013;105:185–99
17. Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, et al. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60(9):2694–703
18. Guangyi Li, Jimin Yin, Junjie Gao, Tak S Cheng, Nathan J Pavlos, Changqing Zhang and Ming H Zheng Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes *Arthritis Research & Therapy* 2013 2013, 15:223

19. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F, National Arthritis Data Workgroup. Arthritis Rheum. 2008 Jan; 58(1):26-35.
20. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole D, Borenstein K, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum. 1986;29:1039-49
21. Felson DT, Naimark A, Anderson J, et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. Arthritis and Rheumatism. 1987;30:914-918
22. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. Arthritis and Rheumatism. 1995;38:1500-1505
23. Sridhar, M.S., et al., Obesity and symptomatic osteoarthritis of the knee. J Bone Joint Surg Br, 94(4): p. 433-40, 2012
24. Ewers, B.J., et al., The extent of matrix damage and chondrocyte death in mechanically traumatized articular cartilage explants depend on rate of loading. J Orthop Res, 2001;19(5): 779-84
25. Hui Michelle, Doherty Michael, Zhang Weiya. Does smoking protect against osteoarthritis? Meta-analysis of observational studies. Ann Rheum Dis. 2011;70:1231-1237
26. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Jan;18(1):24-33.
27. Bijlsma J. W., Berenbaum F., Lefeber F. P. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. Lancet 377, 2115-2126
28. Hochberg MC. Epidemiologic considerations in the primary prevention of osteoarthritis. J Rheumatol 1991;18(10):1438-40
29. Pritzker KP. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. Ann Rheum Dis 1994;53(6):406-20
30. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, Osteoarthritis. J Cell Physiol, 213(3): p. 626-34, 2007
31. Saxne, T., et al., Inflammation is a feature of the disease process in early knee joint osteoarthritis. Rheumatology (Oxford), 2003; 42(7): 903-4
32. Fukuda, Y., et al., Impact load transmission of the knee joint-influence of leg alignment and the role of meniscus and articular cartilage. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2000; 15(7):516-21
33. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. Nat Med 2007;13(2):156-63
34. Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. Cell Mol Life Sci 2002;59(1):5-18
35. Aigner T, Soder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. Nat Clin Pract Rheumatol 2007;3(7):391-9
36. Chia SL, Sawaji Y, Burleigh A, McLean C, Inglis J, Saklatvala J, et al. Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. Arthritis Rheum 2009;60(7):2019-27.

37. Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O'Dowd J, et al. Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther* 2006;8(5):R139.
38. Lories RJ, Luyten FP. Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):287–98.
39. van den Berg WB. Growth factors in experimental osteoarthritis: transformin growth factor beta pathogenic? *J Rheumatol Suppl* 1995;43:143–5.
40. Rutsch F, Terkeltaub R. Parallels between arterial and cartilage calcification: what understanding artery calcification can teach us about chondrocalcinosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(3):302–10.
41. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Gluckert K, et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum* 1992;35(7):806–11.
42. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006;97(1):33–44.
43. Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol* 2000;44(6):707–14.
44. Kronenberg HM. *Developmental regulation of the growth plate. Nature* 2003;423(6937):332–6, Provot S, Schipani E. *Molecular mechanisms of endochondral bone development. Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(3):658–65.
45. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. *Bone morphogenetic proteins and articular cartilage to serve and protect or a wolf in sheep clothing's? Osteoarthritis Cartilage* 2010.
46. Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O'Dowd J, et al. Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther* 2006;8(5):R139.
47. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. Nat Med* 2007;13(2):156–63.
48. Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, et al. *Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. Nat Med* 2009;15(12):1421–5.
49. Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am J Pathol* 2005;167(1):97–105.
50. Bergwitz C, Wendlandt T, Kispert A, Brabant G. Wnts differentially regulate colony growth and differentiation of chondrogenic rat calvaria cells. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538(2–3):129–40.
51. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 2003;162(5):899–908.
52. Hwang SG, Ryu JH, Kim IC, Jho EH, Jung HC, Kim K, et al. Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem* 2004;279(25):26597–604.
53. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344(12):907–16.

54. Hwang SG, Ryu JH, Kim IC, Jho EH, Jung HC, Kim K, et al. Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem* 2004;279(25):26597–604
55. Hwang SG, Ryu JH, Kim IC, Jho EH, Jung HC, Kim K, et al. Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem* 2004;279(25):26597–604
56. Ryu JH, Chun JS. Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1beta regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2006;281(31):22039–47
57. David Gvaramia a, Marjolein E. Blaauboer a,b, Roeland Hanemaaijer b, Vincent Everts Role of caveolin-1 in fibrotic diseases *Matrix Biology* 32 (2013) 307–315
58. Struglics, A., et al., Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006; 14(2): 101-13
59. Tetlow LC, Woolley DE. Effect of histamine on the production of matrix metalloproteinases -1, -3, -8 and -13, and TNFalpha and PGE(2) by human articular chondrocytes and synovial fibroblasts in vitro: a comparative study. *Virchows Arch* 2004;445(5):485–90
60. Bijlsma, J. W., Berenbaum, F. & Lafeber, F. P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377, 2115–2126 (2011)
61. Huang, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 2, 231–237 (2009)
62. Singh, G., Miller, J. D., Lee, F. H., Pettitt, D. & Russell, M. W. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with selfreported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Manag. Care* 8, S383–S391 (2002)
63. Puenpatom, R. A. & Victor, T. W. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad. Med.* 121, 9–20 (2009).
64. Engstrom, G., Gerhardsson de Verdier, M., Rollof, J., Nilsson, P. M. & Lohmander, L. S. C-reactive protein, metabolic syndrome and incidence of severe hip and knee osteoarthritis. A population-based cohort study. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 168–173 (2009)
65. Kiefer, F. N. et al. Hypertension and angiogenesis. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1733–1744 (2003)
66. Findlay, D. M. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1763–1768 (2007)
67. Findlay, D. M. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1763–1768 (2007)
68. Imhof, H. et al. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest. Radiol.* 35, 581–588 (2000)
69. Berger, C. E., Kroner, A. H., Minai-Pour, M. B., Ogris, E. & Engel, A. Biochemical markers of bone metabolism in bone marrow edema syndrome of the hip. *Bone* 33, 346–351 (2003)
70. Hamerman, D. & Stanley, E. R. Implications of increased bone density in osteoarthritis. *J. Bone Miner. Res.* 11, 1205–1208 (1996)
71. Shibahara, M. et al. Increased osteocyte apoptosis during the development of femoral head osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. *Acta Med. Okayama* 54, 67–74 (2000)

72. Kerachian, M. A. et al. A rat model of early stage osteonecrosis induced by glucocorticoids. *J. Orthop. Surg. Res.* 6, 62 (2011).
73. Lippiello, L., Walsh, T. & Fienhold, M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism* 40, 571–576 (1991)
74. Hart, D. J., Doyle, D. V. & Spector, T. D. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J. Rheumatol.* 22, 1118–1123 (1995)
75. Oliviero, F. et al. Apolipoprotein A-I and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 27, 79–83 (2009)
76. Gkretsi, V., Simopoulou, T. & Tsezou, A. Lipid metabolism and osteoarthritis: lessons from atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* 50, 133–140 (2011)
77. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism* 1991;40:571–6.
78. Tsezou A, Iliopoulos D, Malizos KN, et al. Impaired expression of genes regulating cholesterol efflux in human osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res* 2010;28:1033–9
79. Sowers M, Karvonen-Gutierrez CA, Palmieri-Smith R, et al. Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Rheum* 2009;61:1328–36
80. R.G. Parton, B. Joggerst, K. Simons Regulated internalization of caveolae *J. Cell Biol.*, 127 (1994), pp. 1199–1215
81. P. Stralfors Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes *Adv Exp Med Biol*, 729 (2012), pp. 111–126
82. M.R. Siddiqui, Y.A. Komarova, S.M. Vogel, X. Gao, M.G. Bonini, et al. Caveolin-1-eNOS signaling promotes p190RhoGAP-A nitration and endothelial permeability *J Cell Biol*, 193 (2011), pp. 841–850
83. Parolini, I. et al. (1999) Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 274, 25718–25725
84. H. Kogo, T. Aiba, T. Fujimoto Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs *J. Biol. Chem.*, 279 (2004), pp. 25574–25581
85. Parat The biology of caveolae: achievements and perspectives *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 273 (2009), pp. 117–162
86. Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2002;13:2502
87. Cho KA, Ryu SJ, Park JS, Jang IS, Ahn JS, Kim KT, et al. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 2003;278:27789–95
88. Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10339–10343
89. Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol.* 1994;4:231–235. doi: 10.1016/0962-8924(94)90114-7
90. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, G alpha subunits and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, Caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-

activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996;271:29182–29190. doi:

10.1074/jbc.271.46.29182

91. Sun, C., Wang, N., Huang, J., Xin, J., Peng, F., Ren, Y., Zhang, S., Miao, J., 2009. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C prevents bone marrow stromal cell senescence in vitro. *J. Cell Biochem.* 108, 519–528
92. Yudoh, K., Shi, Y., Karasawa, R., 2009. Angiogenic growth factors inhibit chondrocyte ageing in osteoarthritis: potential involvement of catabolic stress-induced overexpression of caveolin-1 in cellular ageing. *Int. J. Rheum. Dis.* 12, 90–99
93. Vaughan, E.W. Howard, J.J. Tomasek Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast *Exp. Cell Res.*, 257 (2000), pp. 180–189
94. Hinz Formation and function of the myofibroblast during tissue repair *J. Invest. Dermatol.*, 127 (2007), pp. 526–537
95. B. Eckes, R. Nischt, T. Krieg Cell–matrix interactions in dermal repair and scarring *Fibrogenesis Tissue Repair*, 3 (2010)
96. M. Kasper, T. Reimann, U. Hempel, K.W. Wenzel, A. Bierhaus, D. Schuh, V. Dimmer, G. Haroske, M. Muller Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis *Histochem. Cell Biol.*, 109 (1998), pp. 41–48
97. S.K. Miyasato, J. Loeffler, R. Shohet, J. Zhang, M. Lindsey, C.J. Le Saux Caveolin-1 modulates TGF-beta1 signaling in cardiac remodeling *Matrix Biol.*, 30 (2011), pp. 318–329
98. Gvaramia D, Blaauboer ME, Hanemaaijer R, Everts V. Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. *Matrix Biol.* 2013 Aug 8;32(6):307-15
99. J.G. Goetz Bidirectional control of the inner dynamics of focal adhesions promotes cell migration *Cell Adhes. Migr.*, 3 (2009), pp. 185–190
100. K.A. Cho, S.J. Ryu, Y.S. Oh, J.H. Park, J.W. Lee, H.P. Kim, K.T. Kim, I.S. Jang, S.C. Park Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status *J. Biol. Chem.*, 279 (2004), pp. 42270–42278
101. Frank PG, Pavlides S, Cheung MW, Daumer K, Lisanti MP. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Jul;295(1):C242-8
102. Philippe G. Frank, Stephanos Pavlides, Michelle W.-C. Cheung, Kristin Daumer, and Michael P. Lisanti Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Jul; 295(1): C242–C248
103. Frank PG1, Lisanti MP. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia *Curr Opin Lipidol.* 2004 Oct;15(5):523-9
104. Martin, J.A., Buckwalter, J.A., 2001. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56, B172–B179
105. Dai, S.M., Shan, Z.Z., Nakamura, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., Yudoh, K., 2006. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 818–831

106. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Mar;54(3):818-31
107. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene* 234,177-186,1999
108. Collins F.S., Guyer M.S, & Charkravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278, 1581-1585.1997
109. Miller G.M & Madras B.K Polymorphism s in the 5'- untranslated region of the human serotonin receptor 1B(HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry* 7, 44-55, 2002.
110. Chen S, Wang C, Wang X, Xu C, Wu M, Wang P, Tu X, Wang QK. Significant Association Between CAV1 Variant rs3807989 on 7p31 and Atrial Fibrillation in a Chinese Han Population. *J Am Heart Assoc*. 2015 May 7;4(5)
111. Pojoga LH, Underwood PC, Goodarzi MO, Williams JS, Adler GK, Jeunemaitre X, Hopkins PN, Raby BA, Lasky-Su J, Sun B, Cui J, Guo X, Taylor KD, Chen YD, Xiang A, Raffel LJ, Buchanan TA, Rotter JI, Williams GH. Variants of the caveolin-1 gene: a translational investigation linking insulin resistance and hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Aug;96(8):E1288-92
112. Grilo A, Fernandez ML, Beltrán M, Ramirez-Lorca R, González MA, Royo JL, Gutierrez-Tous R, Morón FJ, Couto C, Serrano-Rios M, Saez ME, Ruiz A, Real LM. Genetic analysis of CAV1 gene in hypertension and metabolic syndrome. *Thromb Haemost*. 2006 Apr;95(4):696-701
113. Pereira D, Peleteiro B, Araujo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(11):1270–85
114. Bijlsma, J. W., Berenbaum, F. & Lefeber, F. P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377, 2115–2126 (2011)
115. Day-Williams AG, Southam L, Panoutsopoulou K, Rayner NW, Esko T, Estrada K, et al. A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2011;89:446-50
116. Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ, Stykarsdottir U, Zhu Y, Meulenbelt I, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis* 2011;70:3 49-55
117. Castano-Betancourt MC, Cailotto F, Kerkhof HJ, Cornelis FM, Doherty SA, Hart DJ, et al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:82 18-23
118. Evangelou E, Valdes AM, Castano-Betancourt MC, Doherty M, Doherty S, Esko T, et al. The DOT1L rs12982744 polymorphism is associated with osteoarthritis of the hip with genome-wide statistical significance in males. *Ann Rheum Dis* 2013;72:126 4-5
119. Evangelou E, Kerkhof HJ, Stykarsdottir U, Ntzani EE, Bos SD, Esko T, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann Rheum Dis* 2013
120. Castano-Betancourt M, Evans D, Liu Y, Yau M, Uitterlinden A,
121. Evangelou V, et al. Novel variants for cartilage thickness and hip osteoarthritis: revealing genes implicated in cartilage and bone development. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014;22:S41

122. Panoutsopoulou K, Metrustry S, Doherty SA, Laslett LL, Maciewicz RA, Hart DJ, et al. The effect of FTO variation on increased osteoarthritis risk is mediated through body mass index: a mendelian randomisation study. *Ann Rheum Dis* 2013
123. Ruedel A, Stark K, Kaufmann S, Bauer R, Reinders J, Rovensky J, et al. N-cadherin promoter polymorphisms and risk of osteoarthritis. *FASEB J* 2014;28:6 83-91
124. Bos SD, Bovee JV, Duijnisveld BJ, Raine EV, van Dalen WJ, Ramos YF, et al. Increased type II deiodinase protein in OAaffected cartilage and allelic imbalance of OA risk polymorphism rs225014 at DIO2 in human OA joint tissues. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1254-8
125. Li T1, Sotgia F, Vuolo MA, Li M, Yang WC, Pestell RG, Sparano JA, Lisanti MP. Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status *Am J Pathol.* 2006 Jun;168(6):1998-2013